

# **Untersuchung der Propeptid-katalysierten Faltung von Cathepsin K**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Saskia Sehmisch,

geboren am 11.03.1982 in Leipzig

## Gutachter

1. Prof. Dr. B. Wiederanders, Jena
2. Prof. Dr. R. Klinger, Jena
3. Prof. Dr. G. Fischer, Halle

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.07.2005

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Zusammenfassung	2
3	Einleitung	4
3.1	Allgemeines: Struktur, Biosynthese und Funktion von Cathepsin K	4
3.2	Struktur und Funktion der Cathepsin K Proregion – Inhibitorfunktion und Foldasewirkung	5
3.3	Problemstellung	8
4	Materialien und Methoden	9
4.1	Materialien	9
4.1.1	Reagenzien	9
4.1.1.1	Cathepsin K-Reagenzien	9
4.1.1.2	Cathepsin S-Reagenzien	9
4.1.1.3	Weitere Reagenzien	9
4.1.2	Medien	10
4.1.2.1	Cathepsin K-Medien	10
4.1.2.2	Cathepsin S-Medien	10
4.1.3	Geräte	10
4.1.4	Computerprogramme	11
4.2	Methoden	12
4.2.1	Messung der Enzymaktivitäten	12
4.2.2	Abbau des Cathepsin K-Propeptids durch Pepsin (Clearing)	13
4.2.3	Denaturierung von Cathepsin K	14
4.2.4	Renaturierung des Cathepsin K-Propeptid-Komplexes	14
4.2.5	Zentral zusammengesetzte Versuchspläne 2. Ordnung	15
5	Ergebnisse	18
5.1	Entfernung des inhibitorischen Propeptids vor der Messung der Cathepsin-K-Aktivität (Clearing)	19
5.2	Optimierung der Renaturierungsbedingungen	22

5.2.1	Einfluss der Tris-, Arginin-, GSH- und GSSG-Konzentration sowie des pH-Wertes auf die Renaturierungsausbeute_____	23
5.2.2	Auswirkung der Anwesenheit von Salzen auf die Renaturierungsausbeute_____	27
5.2.3	Untersuchung weiterer möglicher Einflussfaktoren_____	28
5.2.4	Einfluss von Propeptidkonzentration und Temperatur auf Geschwindigkeit und Ausmaß der Renaturierung_____	31
5.2.5	Zusammenfassung der Versuche zur Optimierung der Renaturierungsbedingungen_____	33
5.3	Prüfung der Spezifität der Foldasewirkung des Cathepsin K-Propeptids_____	34
5.3.1	Einsatz von Peptidinhibitoren_____	34
5.3.2	Nachweis der Spezifität der Propeptid-katalysierten Faltung von Cathepsin K und Cathepsin_____	37
6	Diskussion_____	39
7	Literaturverzeichnis_____	45

Danksagung

Ehrenwörtliche Erklärung

Lebenslauf

**1 Abkürzungsverzeichnis**

AMC	7-Amino-4-methylcumarin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FE	Fluoreszenzeinheiten
Gnd	Guanidin
GndHCl	Guanidinhydrochlorid
GSH	Glutathionsulphydryl
GSSG	Glutathiondisulfid
$K_i$	Dissoziationskonstante eines Enzym-Inhibitor-Komplexes
MHC	major histocompatibility complex
NaAc	Natriumacetat
NaCit	Natriumzitat
NMR	nuclear magnetic resonance
$pK_a$	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstanten der Säure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Z	Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe

## 2 Zusammenfassung

Cathepsin K ist ein Vertreter der Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen, welche der Papain-Familie angehören. Wie die meisten Proteasen wird es als inaktives Proenzym synthetisiert. Zum Schutz vor unerwünschter Proteolyse bei der Biosynthese blockiert eine 99 Aminosäuren lange Proregion das aktive Zentrum. Diese Hauptfunktion, die Inhibition der katalytischen Aktivität des Mutterenzyms, haben alle Proregionen der Cysteinproteasen gemein. Daneben haben sie aber unterschiedliche Bedeutung für die Stabilisierung, Zielsteuerung und korrekte Faltung ihrer Mutterenzyme während der Biosynthese. Letzteres wird auch als Foldasewirkung bezeichnet. Sie konnte bisher für die Proregionen der Cathepsine L und S nachgewiesen werden. Bei den Cathepsinen B und X mit deutlich kürzeren, anders strukturierten Prosequenzen, wird an dieser Frage noch geforscht. Untersuchungen zur Foldasewirkung der Proregionen in der Papain-Familie erscheinen deshalb besonders interessant, weil sich die Strukturen der Propeptide stark, die der Enzyme aber vergleichsweise nur wenig unterscheiden.

Ich optimierte die Bedingungen für die Propeptid-katalysierte Renaturierung von Cathepsin K, einem nahen Verwandten von Cathepsin S, um anschließend mit diesen beiden Enzymen beispielhaft vergleichende Untersuchungen zur Spezifität der Foldasewirkung durchführen zu können. Kernstück der experimentellen Arbeit war die sorgfältige Testung zahlreicher Faktoren, die möglicherweise Einfluß auf die Renaturierung haben. Als optimal erwies sich eine 2-3 stündige Inkubation des denaturierten Enzyms bei 19°C nach 1/100 Verdünnung in einem Medium folgender Zusammensetzung: 0,914 M TRIS pH 8,0 / 0,75 M Arginin / 22,2 mM GSH / 6,6 mM GSSG / 0,7 M MgSO<sub>4</sub> / 197 mM GndHCl / 23 % Glycerol / 5 µM Propeptid. Insbesondere durch den Zusatz von MgSO<sub>4</sub> konnte die Renaturierungsausbeute auf 60 bis 90 % der eingesetzten Enzymaktivität gesteigert werden. Voraussetzung für diese Untersuchungen war die Beherrschung eines empfindlichen enzymatischen Nachweisverfahrens für das Enzym und einer Methode zur Zerstörung des inhibitorischen Propeptids vor der Aktivitätsmessung. Bei diesen methodischen Vorarbeiten konnte ich mich weitgehend an den Ergebnissen systematischer Untersuchungen in der eigenen Arbeitsgruppe zu Möglichkeiten der Entfernung des inhibitorischen Propeptids mit nachfolgender Messung der Cathepsin K- Aktivität orientieren. Ich nutzte die dort gegebenen abschließenden Empfehlungen und kombinierte die proteolytische Zerstörung des inhibitorischen Propeptids durch Zusatz von 20 µM Pepsin mit dem empfindlichen Aktivitätsnachweis unter Verwendung des fluorogenen Substrates Z-Leu-Arg-AMC.

Die hohe Renaturierungsausbeute war eine ideale Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen zur Spezifität der Foldasefunktion der Proregionen von Cathepsin K und Cathepsin S. Die erste Frage war die nach einem möglichen Zusammenhang zwischen Inhibitor- und Foldasefunktion. Den gibt es nicht, denn niedermolekulare Dipeptid-Nitril-Inhibitoren steigerten, im Gegensatz zu den Propeptiden, bei vergleichbarer Inhibitionswirkung die Renaturierungsausbeute bei beiden Enzymen nicht. Das spricht dafür, daß die Foldasefunktion eine eigenständige Funktion der beiden untersuchten Propeptide ist, also nicht nur eine Folge ihrer Hemmwirkung. Daraus ergab sich die nächste Frage: Können Propeptide aus der Papain-Familie nur die Faltung ihres Mutterenzym oder auch die von verwandten Enzymen katalysieren? Durch Renaturierung der Cathepsine K und S sowohl mit ihrem eigenen als auch mit dem Propeptid des verwandten Cathepsins fanden wir die nahezu absolute Spezifität der Foldasewirkung der beiden Propeptide. Dieses Ergebnis war überraschend, da solche Spezifität bezüglich der Inhibitionswirkung nicht beobachtet werden kann. Das ist auch eine zusätzliche, indirekte Antwort auf die erste Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen Hemm- und Foldasefunktion. Solche Untersuchungen gibt es bisher noch in keiner Protein-Familie. Sie könnten der Ausgangspunkt zu weiteren Experimenten werden, die zu einem besseren Verständnis der bei der Proteinfaltung ablaufenden Vorgänge führen.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Allgemeines: Struktur, Biosynthese und Funktion von Cathepsin K

Cathepsin K ist eine lysosomale Cysteinprotease aus der Papain-Familie. Charakteristisch für diese Proteasen ist der Aufbau der dreidimensionalen Struktur aus zwei etwa gleich großen Domänen und der zentralen Substratbindungsstelle mit dem aktiven Zentrum, bestehend aus den Aminosäureseitenketten Cystein 139 und Histidin 276. Von zentraler Bedeutung für die katalytische Wirkung ist die SH-Gruppe des Cysteinrestes 139, die durch die Nachbarschaft des Histidins 276 ionisiert wird und in dieser Form die entscheidende nucleophile Attacke auf das Kohlenstoffatom der zu spaltenden Peptidbindung ausübt. Um unerwünschte Proteolyse während der Biosynthese von Proteasen zu verhindern, bleibt das katalytische Zentrum vorübergehend ausgeschaltet. Bei den Mitgliedern der Papain-Familie geschieht das durch die Proregion. Zunächst wird der inaktive Vorläufer, das Prä-Proenzym, von membranständigen Ribosomen gebildet und von der Präsequenz, die anschließend sofort abgespalten wird, ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums dirigiert. Nach Verpackung des Procathepsins in Vesikel erfolgt der Transport zu den Lysosomen. In den Lysosomen kommt es durch den sauren pH-Wert zur Abspaltung der Prosequenz, also der Prozessierung des Zymogens zum aktiven Enzym.

Aufgrund verschiedener Größe und Struktur der Proregion wird die Papainfamilie in drei Unterfamilien klassifiziert (Karrer et al. 1993, Wang et al. 1998, Wex et al. 1999). Das sind die Cathepsin L-ähnlichen (wie z.B. Cathepsin K, L, S und H), die Cathepsin F-ähnlichen (Cathepsin F und W) und die Cathepsin B-ähnlichen Cysteinproteasen. Cathepsin X zeigt entfernte Verwandtschaft zum Cathepsin B, wird dieser Unterfamilie aber nicht zugeordnet. Die Länge ihrer jeweiligen Proregionen reicht von 38 (Cathepsin X) bis 251 Aminosäuren (Cathepsin F). Procathepsin K weist eine 99 Aminosäuren lange Proregion auf, ähnlich wie Cathepsin L und S mit 100 Aminosäuren langen Proregionen.

Die lysosomalen Cysteinproteasen gehören zu den Cathepsinen, deren pH-Optima sich im Laufe der Evolution an das saure Milieu der Lysosomen anpasste. Der Name geht auf die anfänglich vermutete Hauptfunktion, den Abbau zelleigener oder phagozytierter Proteine zurück. Die meisten Cathepsine sind Endopeptidasen (z.B. Cathepsin L, S und K), es gibt aber auch Amino- (z.B. Cathepsin H) und Carboxypeptidasen (z.B. Cathepsin B und X). Inzwischen hat sich herausgestellt, dass Cathepsine aufgrund geringfügig verschiedener pH-Optima, Stabilitäten und Spezifitäten auch bei einer Vielzahl anderer physiologischer und pathologischer Prozesse eine große Rolle spielen. Cathepsin S hat beispielsweise Bedeutung bei der Antigenpräsentation über den MHC II-Komplex (Shi et al. 1999, Villadangos et al.

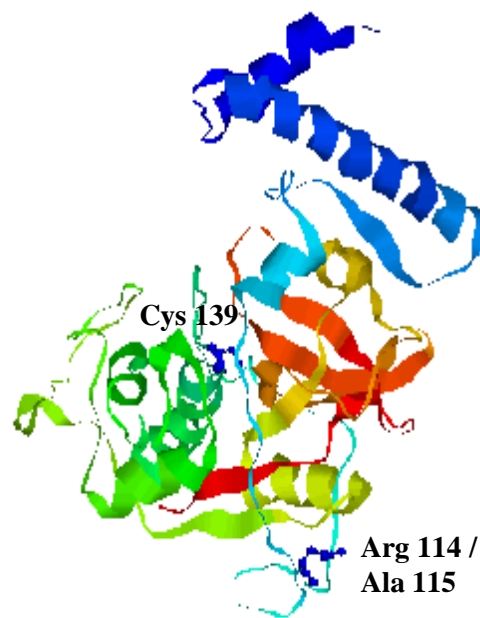


1999). Bei der Antigenpräsentation in Thymusepithelien spielt Cathepsin L eine entscheidende Rolle (Nakagawa et al. 1998). Cathepsin K hat dagegen die Fähigkeit tripelhelikales Kollagen zu spalten, wie es vor allem in Osteoblasten produziert wird (Brömme und Okamoto 1995, Drake et al. 1996). Auf dem im Vergleich zu anderen Cysteinproteasen häufigen Vorkommen in Osteoklasten und Osteoklasten-ähnlichen Multikernzellen begründete sich die Vermutung einer Beteiligung des Cathepsin K am Knochenumbau. Diese Erkenntnisse beruhen vor allem auf Tierexperimenten mit Mäusen, denen das Gen für Cathepsin K ausgeschaltet wurde. Bei Cathepsin K-defizienten Mäusen beobachtet man Funktionseinschränkungen der Osteoklasten mit herabgesetzter resorptiver Aktivität und nachfolgender Osteopetrose (Saftig et al. 1998, Gowen et al. 1999). Die Bedeutung von Cathepsin K für den Abbau des Typ 1 Kollagens des Knochens zeigten neben den Tierexperimenten auch pathobiochemische Beobachtungen am Menschen (Garnero et al. 1998, Kafienah et al. 1998, Atley et al. 2000). Beim Auftreten von Punktmutationen im Cathepsin K-Gen kommt es beispielsweise zu Erkrankungen wie Pyknodysostose (auch Maroteaux-Lamy-Syndrom genannt) und Skelett-Dysplasien (Gelb et al. 1996, Hou et al. 1999, Fujita et al. 2000). Der Beitrag von Cathepsin K und anderen Proteasen zur Rheumatoiden Arthritis und anderen gelenkzerstörenden Erkrankungen wird gegenwärtig intensiv erforscht. Als Enzym der Synovia-Fibroblasten könnte es zum Abbau von Gelenkknorpel- und Knochengewebe beitragen (Hou et al. 2001). Die Beobachtung solcher Überfunktionen des Enzyms, die auch bei anderen Erkrankungen eine Rolle spielen, führte zur Suche nach Inhibitoren, welche in Zukunft in der Pharmakotherapie eingesetzt werden könnten, eventuell sogar auch zur Therapie der Volkskrankheit Osteoporose. Das alles erklärt das große medizinische Interesse an Erkenntnissen der Grundlagenforschung zu Eigenschaften und Funktionen des Cathepsin K.

### **3.2 Struktur und Funktion der Cathepsin K Proregion – Inhibitorfunktion und Foldasewirkung**

Die dreidimensionale Struktur des humanen Procathepsin K konnte in den vergangenen Jahren mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden (Abbildung 1) (LaLonde et al. 1999). Wie bereits erwähnt, sind die Vertreter der Papain-Superfamilie durch den Aufbau aus zwei etwa gleich großen Domänen und der dazwischen liegenden Substratbindungsstelle, dem aktiven Zentrum, gekennzeichnet. N-terminal ist das Enzym mit der aus 99 Aminosäuren bestehenden Proregion kovalent verbunden, die in einer kleinen Domänenstruktur (Minidomäne) endet. N-terminal befinden sich die beiden kreuzenden  $\alpha_1$ -

und  $\alpha_2$ -Helices, gefolgt von der Supersekundärstruktur, welche sich aus einem Teil der  $\alpha_2$ -Helix, einer Schleife und einem  $\beta$ -Faltblatt zusammensetzt. Darauf folgt die kurze  $\alpha_3$ -Helix und abschließend C-terminal ein gestreckter Teil, der in der Substrat-bindenden Spalte liegt. Letzterer realisiert offensichtlich die inhibitorische Funktion der Proregion, wird dabei aber zusätzlich durch die Supersekundärstruktur an der Propeptid-bindenden Schleife des Enzyms verankert. Trotz seiner Lage zwischen den beiden Domänen des Enzyms im aktiven Zentrum wird dieser Teil der Proregion nicht gespalten, denn seine Orientierung ist der der Substrate entgegengesetzt.



**Abbildung 1: Dreidimensionale Struktur von Procathepsin K.** Entnommen aus der SWISS Prot Datenbank (Eintrag 1BY8, LaLonde et al. 1999). Das Enzym baut sich aus den zwei etwa gleich großen Domänen (grün bzw. orangerot), der dazwischen liegenden Substratbindungsstelle und der 99 Aminosäuren langen Proregion (blau) auf. Beschriftet ist Cystein 139 als Teil des katalytischen Zentrums, und Arginin 114 / Alanin 115, die Übergangsstelle von der Proregion zum reifen Enzym.

Die Funktion der Proregion im kovalent gebundenen Zustand wurde vor allem durch die Beobachtung von Funktionsausfällen (Fehlfaltung, Instabilität, falsche Lokalisation in der Zelle) nach Mutationen (von Punktmutationen bis zu umfangreichen Deletionen) (Smith und Gottesman 1989, Kreusch et al. 2000) aufgeklärt. Ergänzt wurden diese Untersuchungen durch zahlreiche Arbeiten mit Propeptiden, wie Proregionen im freien Zustand bezeichnet werden. Erstmals gelang die Herstellung eines isolierten synthetischen Propeptids beim Cathepsin B (Fox et al. 1992). Dadurch konnte die starke und bei diesem Enzym auch

selektive Inhibitorwirkung auf das reife Enzym nachgewiesen werden. Ähnliche Untersuchungen mit vergleichbaren Ergebnissen sind inzwischen mit fast allen menschlichen Cathepsinen publiziert worden (Wiederanders et al. 2003). Mit dem Propeptid des Cathepsin S konnte im Matrigel-Assay sogar die Hemmung der Penetration von Tumorzellen nachgewiesen werden (Kolkhorst et al. 1998). Dass Propeptide genauso wie ihre Proregionen als hochaffine Inhibitoren wirken, spricht für eine ähnliche Struktur. Darauf deuten z.B. auch Messungen des Circular Dichroismus und der endogenen Tryptophanfluoreszenz hin (Fox et al. 1992, Li et al. 1995, Maubach et al. 1997, Billington et al. 2000, Pietschmann et al. 2002). Ein endgültiger Beweis müsste aber durch NMR oder Röntgenstrukturanalyse erfolgen, das ist noch nicht geschehen (Kaulmann 2004).

Für eine von der Anwesenheit des Enzyms unabhängige Strukturierung der Proregion spricht auch die Tatsache, dass die Proregion auch als Foldase wirken kann (Kojima et al. 1998). Foldasen sind Faltungskatalysatoren bei der Ausbildung der nativen Struktur von Proteinen. Sie können bei der Faltung Geschwindigkeits-limitierte Schritte beschleunigen und fehlerhafte Faltungen vermeiden. Ursprünglich wurden die Proregionen auch als „intramolekulare Chaperone“ bezeichnet (Vijayalakshmi et al. 2001). Im Gegensatz zu Chaperonen, welche unspezifisch die meist ATP-abhängige Bildung der Struktur neusynthetisierter Polypeptidketten beschleunigen, fungieren Proregionen als spezifische Faltungshilfen ihrer Mutterenzyme. Dabei dient die Struktur der Proregion wahrscheinlich als Matrize für die Ausbildung von Abschnitten der Raumstruktur des Enzyms, die sich spontan nicht ausbilden können. In der Literatur ist dieses Phänomen ausführlich bei zwei Serinproteasen untersucht und beschrieben worden. Für Subtilisin (Zhu et al. 1989) und  $\alpha$ -lytische Protease (Sohl et al. 1998) wurden strukturelle bzw. energetische Details der Faltungskatalyse des Mutterenzym durch die Proregion publiziert. Für die Cysteinproteasen stehen solche systematischen Untersuchungen noch aus, eine Foldasewirkung der Proregionen einzelner Vertreter wird aber schon lange vermutet (Smith und Gottesman 1989, Tao et al. 1994) und ist für die Cathepsine L und S inzwischen auch in so genannten *trans*-Experimenten eindeutig nachgewiesen worden (Yamamoto et al. 1999, Pietschmann 2002). In *trans*-Ansätzen wird das freie Propeptid zur Renaturierung des Mutterenzym eingesetzt, unter *cis*-Ansätzen versteht man die Renaturierung des Proenzym, wenn die Proregion also noch kovalent über eine Peptidbindung mit dem Mutterenzym verbunden ist. Beim Cathepsin S wurde beobachtet, dass es im Vergleich zur Spontanrenaturierung zu einer erheblichen Steigerung der Renaturierungsgeschwindigkeit des Enzyms durch Zugabe des Propeptids zu denaturiertem Enzym kommt, dieser Effekt aber bei der Zugabe von bestimmten Mutanten

des Propeptids ausbleibt (Pietschmann 2002). Für eine Foldasefunktion der Proregion von Cathepsin K gibt es bereits einen Hinweis (Hou et al. 1999). *Trans*-Experimente zu den Foldaseeigenschaften des Propeptids von Cathepsin K sind bisher nicht publiziert worden.

### 3.3 Problemstellung

- Cathepsin K ist der nächste Verwandte des Cathepsin S (Inaoka, Bilbe et al. 1995, Bossard, Tomaxzek et al. 1996, Lecaille, Kaleta et al. 2002). Für Cathepsin S gab es umfangreiche Untersuchungen in der eigenen Arbeitsgruppe zur Foldasefunktion des Propeptids. Ein Vergleich der Renaturierung der beiden Enzyme in Anwesenheit ihrer Propeptide sollte der Prüfung der Hypothese einer generellen Foldasefunktion der Propeptide der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen dienen.
- Falls sich auch die *in vitro* Faltung des Cathepsin K als Propeptid-abhängig erweist, sollten vergleichende Untersuchungen zur Spezifität und Effektivität der Faltungskatalyse folgen. Solche Fragen wurden bisher noch in keiner Proteinase-Familie untersucht.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Reagenzien

##### 4.1.1.1 Cathepsin K-Reagenzien

###### Humanes rekombinantes Cathepsin K

Hefe-Expressionen von D. Brömme; Ass. Prof. Dept. Hum. Genetics; Mount Sinai School of Medicine; Fifth Avenue at 100 st Street; New York 10029. Gelöst in 50 mM Natriumacetat pH 5,5 / 1 M NaCl / 0,5 mM DTT (Linnevers, McGrath et al. 1997).

###### Cathepsin K- Propeptid

Bakteriell exprimiertes humanes Cathepsin K-Propeptid aus der eigenen Arbeitsgruppe. Gelöst in 0,5 M Guanidinhydrochlorid / 50 mM NaAc pH 4,5 / 15 % Acetonitril (Schlabrakowski 2003).

###### Cathepsin K-Substrat

Z-Leu-Arg-AMC (Calbiochem) als 10 mM Stammlösung in DMSO.

##### 4.1.1.2 Cathepsin S-Reagenzien

###### Humanes rekombinantes Cathepsin S

Aus eigener Arbeitsgruppe durch Expression des Procathepsin S in E. coli (Kramer 2004). Gelöst in Natriumphosphatpuffer 25 mM pH 6,5 / 150 mM NaCl / 50 mM Acetat / 2 mM DTT / 2 mM EDTA / ca. 0,4 % Triton X100 / 0,02 % Acid.

###### Cathepsin S-Propeptid

Bakteriell exprimiertes humanes Cathepsin S-Propeptid aus der eigenen Arbeitsgruppe. Gelöst in 50 mM NaAc pH 4,5 / 0,5 M GndHCl / 15 % Acetonitril (Maubach, Schilling et al. 1997).

###### Cathepsin S-Substrat

Z-Val-Val-Arg-AMC (Bachem) als 10 mM Stammlösung in DMSO.

##### 4.1.1.3 Weitere Reagenzien

###### Pepsin

Aus Schweinemagen (Serva)

Alle anderen hier nicht aufgeführten Reagenzien stammten von verschiedenen Herstellern und hatten mindestens den Reinheitsgrad pro analysi.

#### 4.1.2 Medien

##### 4.1.2.1 Cathepsin K-Medien

Denaturierungsmedium: 0,1 M TRIS pH 8,0 / 8 M Gnd / 1 mM EDTA / 0,133 M DTT.

Renaturierungsmedium: 100 mM TRIS pH 7,4 bis 8,2 / 2 mM EDTA / Glutathion-Redoxpuffersystem und weitere Zusätze, welche bei den entsprechenden Experimenten beschrieben werden. Nach Abschluss der Optimierung hatte das Renaturierungsmedium die folgende Zusammensetzung: 0,914 M TRIS pH 8,0 / 0,75 M Arginin / 22,2 mM GSH / 6,6 mM GSSG / 0,7 M MgSO<sub>4</sub> / 197 mM GndHCl / 23 % Glycerol / 5 µM Propeptid.

Clearing-Medium: 100 mM NaCit pH 4,0 / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA / 1 % Chaps / 5 mM DTT und nach Abschluss der Optimierung Pepsin in einer Konzentrationen von 20 µM.

Testmedium: 100 mM NaCit pH 5,3 / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA / 1 % Chaps / 5 mM DTT / 1 % DMSO und, wenn nicht anders aufgeführt, 20 µM Z-Leu-Arg-AMC.

##### 4.1.2.2 Cathepsin S-Medien

Clearing-Medium: 0,1 M Na-Acetat pH 4,2 / 2 mM EDTA / 0,01 % Triton X 100 / 10 µM Pepsin.

Testmedium: 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,5 / 50 mM NaCl / 2 mM EDTA / 0,01 % Triton X 100 / 5 mM DTT / 1 % DMSO / 40 µM Z-Val-Val-Arg-AMC.

#### 4.1.3 Geräte

##### Fluorometer

Mikrotiterplattenfluorometer Spectra Max Gemini (Molecular Devices)

### Mikrotiterplatten

F-Mikrotiterplatten = Fia- Platte schwarz, 96 Well, F- Form (Greiner Bio-One)

V-Mikrotiterplatten = Hard- Shell<sup>TM</sup> Thin- Wall, 96 Well, White Wells (MJ Research)

### pH-Meter

pH- Meter CG 840 (Schott) mit Mikroglaselektrode SenTix (WTW)

### Pipetten

Hubkolbenpipetten verstellbar 2,5 bis 2500 µl Reference- Serie (Eppendorf)

Mehrkanalpipetten verstellbar 10, 50 und 300 µl (Eppendorf)

### Schüttler

Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

### Thermostate

Refrigerated Bath RB-5A (Techne)

Thermostat F10 (Julabo)

Thermostat E1 (Medingen)

### Waage

Waage MC1 (Sartorius)

### Zentrifuge

Centrifuge 5403 (Eppendorf)

## **4.1.4 Computerprogramme**

Word (Microsoft)

Excel (Microsoft)

Prism 4,0 (Graph Pad)

SigmaPlot 8,0 (SPSS Inc.)

SPSS 10,0 (SPSS Inc.)

Cademo (BioMath GmbH)

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Messung der Enzymaktivitäten

Zur Bestimmung der Enzymaktivität eignet sich die fluorometrische Messung der AMC-Abspaltung von synthetischen Peptidsubstraten. Dieses Verfahren ist sehr gut praktikabel und gleichzeitig hochempfindlich. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (22-24°C) in Mikrotiterplatten. Mikrotiterplatten ermöglichen die gleichzeitige Messung von maximal 96 Proben bei etwa 300 µl Gesamtvolumen des Tests. Weil die Proben bei Temperierung der Mikrotiterplatten mit kommerziellen Geräten zu einem Teil verdunsten können und dadurch die Messergebnisse ungenau werden, wurde auf eine Temperaturerhöhung verzichtet.

Neben den für Fluoreszenzmessungen empfohlenen schwarzen Flachbodenplatten der Firma Greiner kamen auch spezielle neue Verbundplatten mit weißen V-förmigen Wells zum Einsatz. Diese haben den Vorteil, dass sie eine deutlich bessere Ausbeute an Fluoreszenzlicht bringen. Ein Nachteil war in manchen Versuchen das geringere Fassungsvermögen der Wells von 200 µl im Vergleich zu den schwarzen Flachbodenplatten mit 300 µl.

Die 5 bis 60 Minuten langen kinetischen Messungen erfolgten mit dem Mikrotiterplattenfluorometer Spectra Max Gemini. Die Wellenlängen für Anregungs- und Emissionslichtstrahl betrugen 360 nm bzw. 440 nm. Da der Anstieg der Fluoreszenz der Produktbildung proportional ist, wurde auf eine Umrechnung verzichtet und die Fluoreszenzänderung als Produktbildung in willkürlichen Einheiten definiert. Ihre zeitliche Änderung ist der Enzymaktivität proportional. Sie wurde durch Regressionsanalyse bestimmt. Im einfachsten Fall konnten die Anstiege durch lineare Regression (Gleichung 1) berechnet werden.

$$P = v_z * t + P_0 \quad \text{Gleichung 1}$$

(P = Produktkonzentration,  $P_0$  = Produktkonzentration zum Zeitpunkt 0, t = Zeit,  $v_z$  = Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei gegebener Substratkonzentration)

Im Falle nicht linearer Produktbildungs-Zeit-Kurven erfolgte die Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit mit Gleichung 2.

$$P = (v_z * t)^{(-b*t)} + P_0 \quad \text{Gleichung 2}$$

(b = Geschwindigkeitsverlust der Reaktion pro Zeiteinheit durch Substratverbrauch und / oder Enzyminaktivierung)



Die Testbedingungen für Cathepsin K wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Ramona Kleint (2004) optimiert. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wählte ich folgendes Testmedium: Zitratpuffer pH 5,3, 5 mM DTT, 1 % DMSO und, falls nicht anders aufgeführt, 20  $\mu$ M Substrat. Als Substrat diente Z-Leu-Arg-AMC, welches die höchste Affinität zum Cathepsin K hat und im Vergleich zu Z-Val-Arg-AMC und Z-Phe-Arg-AMC, die auch von Cathepsin K gespalten werden, nur eine geringe Substrathemmung zeigt.

Die Zusammensetzung des Testmediums für Cathepsin S entnahm ich der Literatur (Maubach et al. 1997): 50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH 6,5 / 50 mM NaCl / 2 mM EDTA / 0,01 % Triton X 100 / 5 mM DTT und 1 % DMSO. Als Substrat setzte ich 40  $\mu$ M Z-Val-Val-Arg-AMC ein.

#### **4.2.2 Abbau des Cathepsin K-Propeptids durch Pepsin (Clearing)**

Aufgrund der hochaffinen Hemmung von Cathepsin K durch sein Propeptid ist es nicht möglich renaturiertes Cathepsin K in Gegenwart seines Propeptids durch eine Aktivitätsmessung nachzuweisen. Daher musste vorher ein Schritt zur spezifischen Zerstörung des Propeptids erfolgen. Solch ein Verfahren ist in der Literatur noch nicht publiziert worden. Die Abspaltung und Zerstörung der Proregionen eines Zymogens wird üblicherweise als Prozessierung bezeichnet. Zur Unterscheidung und gleichzeitig zur sprachlichen Vereinfachung habe ich für mein Vorgehen im Folgenden den kurzen Begriff „Clearing“ verwendet. Aus der Promotionsarbeit von Ramona Kleint (2004) ist zu entnehmen, dass der proteolytische Abbau mit Pepsin gut geeignet ist. Pepsin beeinflusst weder die Stabilität von Cathepsin K noch hydrolysiert es das fluorogene Substrat. Darüber hinaus ist das Verfahren einfach und reproduzierbar. Es musste aber beachtet werden, dass bei pH 4 das Optimum von Pepsin bereits weit überschritten ist. Um eine ausreichende Pepsinwirkung zu sichern mussten hohe Konzentrationen (20  $\mu$ M) eingesetzt werden.

Das Clearing des nach Renaturierung entstandenen Cathepsin K-Propeptid-Komplexes erfolgte daher durch eine 1:10 Verdünnung mit Pepsin-haltigem Clearing-Medium und anschließender Inkubation. Die Inkubation habe ich bezüglich Pepsinkonzentration (10 bis 20  $\mu$ M), Temperatur (20 bis 37 °C) und Zeit (1 bis 90 Minuten) optimiert. Als günstig erwiesen sich 10 Minuten Inkubation bei 30 °C in dem vorn angegebenen Clearing-Medium, das bei der Auswertung aller Renaturierungsexperimente genutzt wurde.

### 4.2.3 Denaturierung von Cathepsin K

Für die geplanten Untersuchungen zur Propeptid-katalysierten Faltung von Cathepsin K benötigte ich denaturiertes Enzym. Bei der Denaturierung werden Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und, in Gegenwart von Reduktionsmitteln, auch Disulfidbrücken gelöst. Das native Protein wird so verändert, dass es seine biologische Aktivität und einige physiko-chemische Eigenschaften verliert, aber die Primärstruktur erhalten bleibt.

Bei unseren Experimenten wurde eine 186,7  $\mu\text{M}$  Cathepsin K-Stammlösung (Kleint 2004) 1:4 in Denaturierungsmedium verdünnt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das im Denaturierungsmedium enthaltene Guanidinhydrochlorid hatte die Funktion, nicht kovalente Bindungen fehlgefalteter Moleküle, zu lockern. Aufgrund seiner der Peptidbindung ähnlichen Struktur werden die natürlichen Wasserstoffbrücken gelöst und gleichzeitig auch die Eigenschaften des wässrigen Milieus so verändert, dass die Aggregation hydrophober Reste energetisch nicht mehr begünstigt wird (Nick Pace C und Scholtz JM 1997). Dadurch reduziert es auch den Effekt der Interaktion zwischen zwei Proteinen (Tsumoto et al. 2002). Zur Reduktion der Disulfidbrücken setzte ich 100 mM DTT zu. Der leicht basische pH-Wert von 8,0 begünstigt die Reduktion, da unter diesen Bedingungen SH-Gruppen teilweise dissoziieren (Rudolph et al. 1997).

Es war möglich denaturiertes Cathepsin K auf Vorrat herzustellen, weil es durch die Aufbewahrung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zu keiner Minderung der Qualität kam. In mehrmaligen Versuchen konnten wir feststellen, dass sowohl die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten Proben als auch die sofort verwendeten Proben ein und derselben Charge zu gleichen Ergebnissen führten.

### 4.2.4 Renaturierung des Cathepsin K-Propeptid-Komplexes

Solange die Denaturierung ohne Zerstörung der Primärstruktur einhergeht, ist sie grundsätzlich ein reversibler Vorgang. Die praktische Ausführung der Renaturierung hängt aber einerseits vom Ausmaß der strukturellen Veränderungen ab, die wieder rückgängig gemacht werden müssen, andererseits von den Erkenntnissen und Erfahrungen, die in den letzten Jahren bei der Arbeit mit Proteinen gesammelt werden konnten. Im Falle des Cathepsin K ist die Renaturierung nach GndHCl- und DTT-Behandlung durch starke Verdünnung (1:100) des Denaturans möglich. Dadurch verlieren die im Denaturierungsmittel enthaltenen chemischen Substanzen aufgrund der niedrigen Konzentration ihre Wirkung und die native Proteinstruktur bildet sich zurück. Nachteile der Renaturierung durch Verdünnen sind manchmal das Arbeiten mit großen Volumina und daraus resultierend, die geringe

Proteinkonzentration. Vorteilhaft sind aber der geringere experimentelle Aufwand und die gute Standardisierbarkeit im Vergleich zu anderen Verfahren. Im gegebenen Fall war die Verdünnung das Verfahren der Wahl, da so die Wirkung des Propeptids sofort nach Mischung des Renaturierungsmediums mit dem denaturierten Enzym einsetzen konnte. Da ausschließlich im analytischen Maßstab gearbeitet wurde, waren die Gesamtvolumina der Renaturierungsansätze durch die Pipettiergenauigkeit bei Enzymzugabe (0,53 bis 4 µl) bestimmt.

Zur Optimierung der Renaturierungsausbeute habe ich verschiedene Parameter, u. a. die Konzentration der Komponenten des Redoxsystems, Renaturierungszeit und die Renaturierungstemperatur, variiert. Die genauen Bedingungen und die Gesamtverdünnung des Enzyms sind zu jedem Versuch angegeben.

Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum bis maximal 22 Stunden. In definierten Zeitabständen wurden Aliquots entnommen, die entweder im Originalzustand oder nach 1:10-Verdünnung mit Clearing-Medium bei -80°C bis zum Versuchsende, manchmal auch noch bis zum folgenden Tag aufbewahrt wurden. Das war möglich, da in Vorversuchen ein eventueller Aktivitätsverlust als Folge des Einfrierens ausgeschlossen werden konnte. Auch der Zeitpunkt der Zugabe des Clearing-Mediums hatte keinen Einfluss auf die abschließende Aktivitätsmessung, d.h. gelegentlich wurde bei den Entnahmen von sehr kleinen Aliquots (4 µl) zur Verbesserung der Pipettiergenauigkeit zuerst Clearing-Medium in die Wells gefüllt. Die Renaturierungsausbeute wurde nach Gleichung 3 aus dem Zeitverlauf der Cathepsin K-Aktivität errechnet.

$$A = A_{\max} * (1 - e^{-k*t}) \quad \text{Gleichung 3}$$

(A = gemessene Aktivität,  $A_{\max}$  = Renaturierungsausbeute, k = Geschwindigkeitskonstante der Renaturierung, t = Zeit)

Aus k wurde die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) der Renaturierung nach Gleichung 4 berechnet.

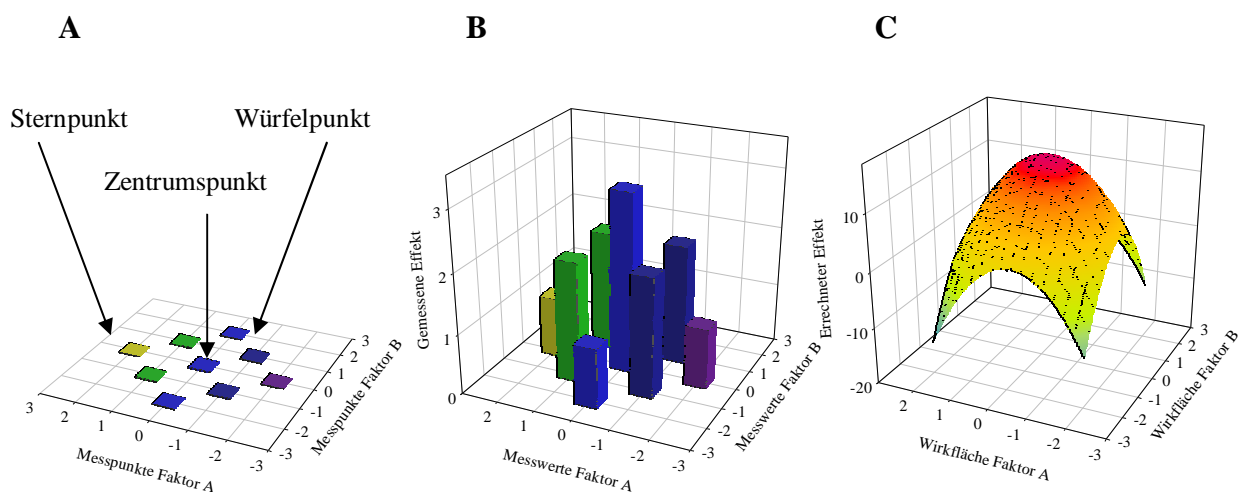
$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad \text{Gleichung 4}$$

#### 4.2.5 Zentral zusammengesetzte Versuchspläne 2. Ordnung

Wie schon erwähnt ist die Optimierung von Renaturierungsbedingungen trotz einiger grundsätzlicher allgemeingültiger Erkenntnisse immer noch eine aufwendige empirische Prozedur, die für jedes Protein individuell durchgeführt werden muss. Aufgrund der

Notwendigkeit der Untersuchung einer Vielzahl möglicher Einflussfaktoren, deren Wirkung nicht-linear von der Konzentration und oft auch noch von den übrigen Faktoren abhängt, ergibt sich ein großer Messaufwand. Deshalb verwendete ich faktorielle Versuchspläne (Rasch et al. 1999), meist zentral zusammengesetzte Versuchspläne 2. Ordnung. Dieses Verfahren ermöglicht mit nur einem Versuch gleichzeitig den Einfluss mehrerer Faktoren sowie deren Wechselwirkungen zu erfassen. Einen solchen Plan möchte ich nachfolgend an einem Beispiel erläutern.

Für die Untersuchung von zwei Faktoren in jeweils fünf Konzentrationen mit allen Wechselwirkungen würde man insgesamt 25 Messpunkte benötigen (vollständiger Versuchsplan). Mit einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung sind dafür nur neun Kombinationen notwendig. Dies beruht darauf, dass bei diesem Verfahren jeweils nur bestimmte Konzentrationen miteinander kombiniert werden müssen, die als Zentrumspunkt (mittlerer Punkt), als Würfelpunkte (um den Zentrumspunkt herumliegend) und als Sternpunkte (außen liegend) bezeichnet werden (Abbildung 2A). Mit dem Programm Cademo war unter Berücksichtigung von statistischen Gesetzmäßigkeiten eine Berechnung der Konzentrationsstufen und der Verteilung der Messpunkte möglich, wenn man für jeden Einflussfaktor die Ober- und Untergrenze des interessanten Konzentrationsbereiches vorgibt. Abbildung 2B zeigt die graphische Darstellung der Messergebnisse des Beispielversuchs.



**Abbildung 2: Illustration der Planung und Auswertung von zentral zusammengesetzten Versuchsplänen 2. Ordnung.**

2A Plan der Anordnung der Messpunkte bei zwei Einflussfaktoren.

2B Fiktive experimentelle Daten.

2C Für den untersuchten Konzentrationsbereich mit Gleichung 5 berechnete Wirkfläche. Aus den Daten der Wirkfläche werden die Konzentrationsoptima der Einflussfaktoren ermittelt.

Durch multiple Regression kann man die unbekannten Größen (Parameter  $b$ ) aus Gleichung 5 berechnen. Diese Gleichung definiert dann auch die Punkte, die nicht gemessen wurden.

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{12}A * B \quad \text{Gleichung 5}$$

( $y$  = Messwert,  $b$  = unbekannte Größen,  $A$  und  $B$  = Einflussfaktoren)

Mit Gleichung 5 ist es möglich eine Wirkfläche zu berechnen und die optimalen Werte der untersuchten Einflussfaktoren zu ermitteln (Abbildung 2C).

## 5 Ergebnisse

Bei der Durchführung der Experimente konnte ich auf folgende Vorarbeiten in der eigenen Arbeitsgruppe aufbauen:

1. Die Cathepsin K-Präparation ist frei von Fremdprotein. Das wurde mittels SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung nachgewiesen. Es konnten auch keine Spuren von Procathepsin K gefunden werden. Aufgrund des höheren Molekulargewichtes des Proenzym (ca. 10 000 Dalton schwerer), wäre es möglich gewesen Reste im Elektropherogramm zu erkennen. Ein Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen Cathepsin K und Procathepsin K bestätigte die Reinheit der verwendeten Cathepsin K-Präparation zusätzlich.

Die Bestimmung der Konzentration an enzymatisch aktivem Cathepsin K erfolgte durch E64- Titration (Barrett et al. 1982). Dieses Verfahren beruht auf der Bindung des Inhibitors E64 an die SH-Gruppe im katalytischen Zentrum, wodurch nach Gleichgewichtseinstellung die Konzentration des aktiven Enzyms ermittelt werden kann. Sie betrug für die von uns benutzte Enzympräparation 186,7  $\mu\text{M}$  (Kleint 2004).

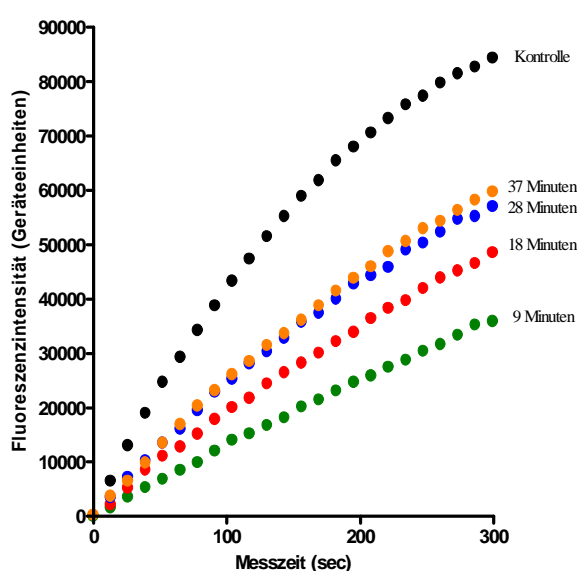
2. Das Propeptid von Cathepsin K ist elektrophoretisch rein und zeigt im Massenspektrogramm das erwartete Molekulargewicht. Die spektrophotometrisch bestimmte Konzentration der Stammlösung betrug 35  $\mu\text{M}$ . Es hemmt sowohl Cathepsin K als auch Cathepsin H, L und S – es ist ein unspezifischer Inhibitor (Schlabrakowski 2003). Die Hemmung von Cathepsin K, L und S ist „slow, tight-binding“ (Baici und Gyger-Marazzi 1982), während die Inhibition von Cathepsin H schwächer ist und einer klassischen Kinetik folgt. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen über die Hemmeigenschaften des Cathepsin K-Propeptids konnte ich meine Untersuchungen zur zweiten Funktion, der Foldasefunktion, planen.

3. Bei der Wahl der Denaturierungsbedingungen bezog ich mich auf Ergebnisse von Sandra Pietschmann (2002). Sie verglich den Effekt von reduzierender und nicht-reduzierender Denaturierung auf die anschließende Renaturierung des Komplexes aus Cathepsin S und seinem Propeptid und stellte fest, dass die Denaturierung unter reduzierenden Bedingungen bezüglich der nachfolgenden Renaturierung deutlich erfolgreicher ist. Ich übernahm die Denaturierungsbedingungen aus der zitierten Arbeit: Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur in 6 M Gnd, 100 mM DTT, 2 mM EDTA und 100 mM TRIS pH 8,0. Meine Kontrollmessungen mit Cathepsin K zeigten den vollständigen Aktivitätsverlust unter diesen Bedingungen.

### 5.1 Entfernung des inhibitorischen Propeptids vor der Messung der Cathepsin K-Aktivität (Clearing)

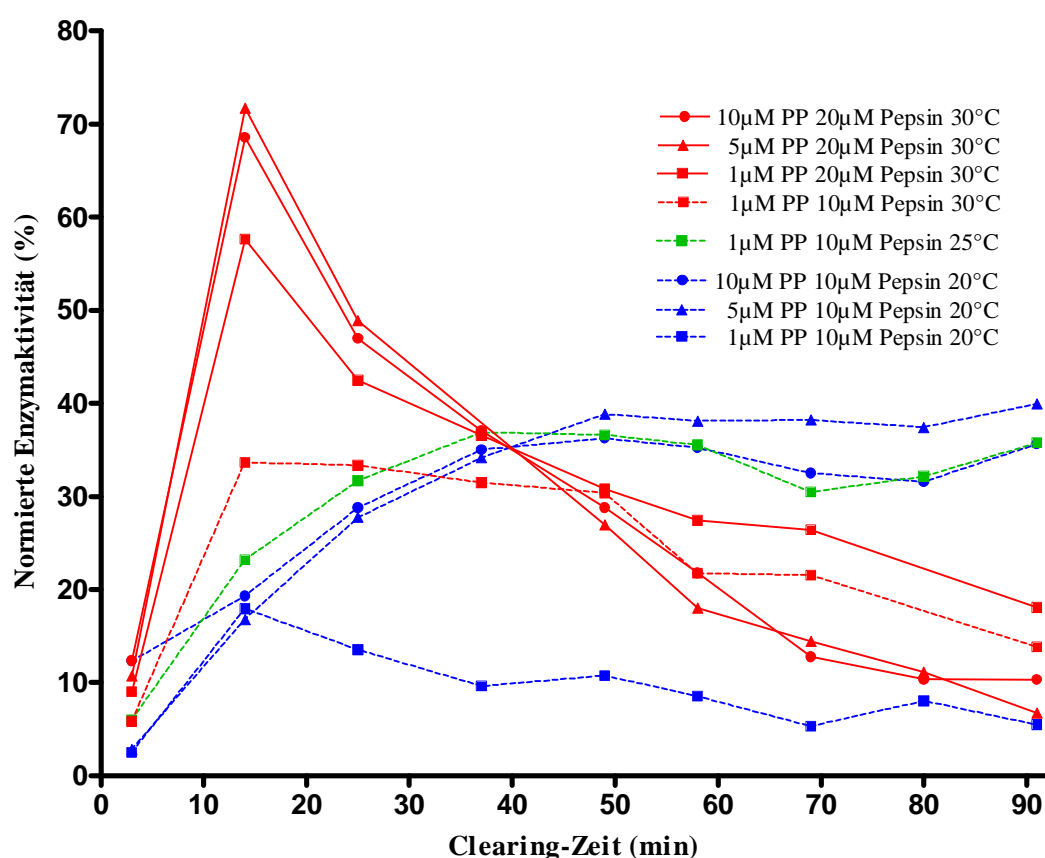
Wie in der Zielstellung ausführlich beschrieben, sollte die Abhängigkeit der Renaturierung von Cathepsin K von der Anwesenheit seines Propeptids untersucht werden. Das überzeugendste und oft auch das einfachste Verfahren zum Nachweis der Wiederherstellung der Struktur eines Enzyms ist der erfolgreiche Nachweis seiner Funktion (Rudolph et al. 1997). Das war auch in diesem Fall geplant. Dabei störte allerdings das im Überschuss anwesende Propeptid, das ein hochwirksamer Inhibitor seines Mutterenzym ist. Aus der Literatur war zu entnehmen, dass bei der gentechnischen Herstellung von Cathepsin K das entsprechende Zymogen erfolgreich mit Pepsin prozessiert wurde (Linnevers et al. 1997, Hou et al. 1999, Brömme et al. 2004). Anlehnend an diese Ergebnisse konnte Ramona Kleint in ihrer Promotionsarbeit (2004) nachweisen, dass kommerziell erhältliches Pepsin auch für den selektiven Abbau des Cathepsin K- Propeptids gut geeignet ist.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen untersuchte ich unter meinen konkreten experimentellen Bedingungen den Einfluss von Pepsin-Konzentration, Temperatur und Clearing-Zeit auf die Wiederfindung der Cathepsin K-Aktivität nach vorangegangener vollständiger Hemmung des Enzyms durch ansteigende Propeptidkonzentrationen. Ein Teil der Rohdaten eines solchen Versuches ist beispielhaft in Abbildung 3 dargestellt. Aus solchen Produktbildungskurven berechnete ich anschließend durch lineare oder nichtlineare Regression die Anfangsgeschwindigkeiten der Produktbildung, die dann als Funktion der Clearing-Zeit dargestellt werden konnten.



**Abbildung 3: Primärdaten zum Einfluss der Clearing-Zeit auf die Wiederfindung der Cathepsin K-Aktivität in Gegenwart seines Propeptids.** 3,73 nM Cathepsin K wurden mit 10  $\mu$ M Propeptid versetzt und danach mit 10  $\mu$ M Pepsin bei 20 °C und pH 4,0 inkubiert. Die wieder gewonnene Enzymaktivität wurde in Aliquots bestimmt, die nach der jeweils an den Kurven angegebenen Clearing-Zeit entnommen wurden. Die Kontrolle enthielt kein Propeptid. Die kinetische Messung der Cathepsin K-Aktivität erfolgte unter den in der Methodik beschriebenen Standardbedingungen in Mikrotiterplatten.

Eine solche Sekundärgrafik zeigt Abbildung 4. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die gemessenen Enzymaktivitäten in Prozent der Propeptid-freien Positivkontrolle in Abhängigkeit von der Clearing-Zeit dargestellt. Die Negativkontrollen enthielten Propeptid aber kein Pepsin, ihre Aktivität war praktisch null. Man erkennt, dass nach anfänglichem Anstieg vor allem bei höherer Temperatur ein deutlicher Aktivitätsverlust eintritt. Die höchste Wiederfindung von etwa 70% ergab sich mit 20  $\mu\text{M}$  Pepsin bei 30 °C nach ca. 15 Minuten. Eine Temperaturerhöhung auf 37 °C und eine Verdopplung der Pepsinkonzentrationen brachten keine weitere Steigerung der Ausbeute (ohne Abbildung).

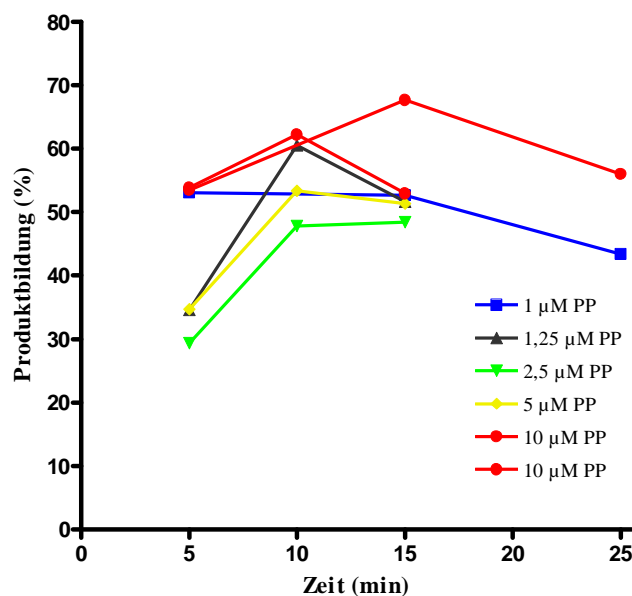


**Abbildung 4: Sekundärdaten zum Einfluss von Propeptid- und Pepsinkonzentration, Temperatur und Clearing-Zeit auf die Wiederfindung der Cathepsin K-Aktivität.** 0,37 nM Cathepsin K wurden mit 1 ( $\square$ ), 5 ( $\Delta$ ) und 10  $\mu\text{M}$  ( $\circ$ ) Propeptid versetzt und danach mit 10 (-----) oder 20  $\mu\text{M}$  (—) Pepsin bei pH 4,0 und Temperaturen von 20 °C (blau), 25 °C (grün) und 30 °C (rot) inkubiert. Die Enzymaktivität wurde nach unterschiedlichen Zeiten in Aliquots, wie in der Methodik beschrieben bestimmt und unter Verwendung von Kontrollmessungen, die kein Propeptid enthielten, normiert.



Von den Cathepsinen S und L war bekannt, dass zur Prüfung der Foldasefunktion 100 bis 1000fach höhere Propeptid-Konzentrationen eingesetzt werden müssen als zur Hemmung (Yamamoto et al. 1999, Pietschmann et al. 2002). Für den hier untersuchten mikromolaren Bereich zeigte sich in allen Versuchen nur eine geringe Abhängigkeit der Wiederfindung der Cathepsin K-Aktivität von der Propeptid-Konzentration. Da vor allem Interesse an einer hohen Wiederfindung bestand, waren die in Abbildung 4 erkennbaren plateauförmigen mittleren Aktivitäten bei geringer Temperatur nach mehr als 50 Minuten Clearing-Zeit uninteressant. In den folgenden Versuchen sollte deshalb der schmale Gipfel bei 30 °C und 5 bis 25 Minuten Clearing-Zeit genauer untersucht werden.

In Abbildung 5 sind zwei Versuche, die an verschiedenen Tagen mit Propeptid-Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  durchgeführt wurden, zusammen dargestellt. In Abständen, die so kurz waren wie es die praktische Durchführung noch zuließ, wurden Aliquots aus dem Clearing-Ansatz entnommen und die Enzymaktivität gemessen. Die höchste Aktivität zeigte sich nach 10 bis 15 Minuten. Die Abhängigkeit von der Propeptid-Konzentration war wiederum nur gering.



**Abbildung 5: Sekundärdaten zum Einfluss von Pepsinkonzentration und Clearing-Zeit auf die Wiederfindung der Cathepsin K-Aktivität nach Hemmung mit seinem Propeptid.** 0,37 nM Cathepsin wurden mit 1 (■), 1,25 (▼), 2,5 (◆), 5 (▲) oder 10  $\mu\text{M}$  (●) Propeptid versetzt und danach mit 20  $\mu\text{M}$  Pepsin bei pH 4,0 und 30 °C inkubiert. Die Enzymaktivität wurde nach unterschiedlichen Zeiten in Aliquots, wie in der Methodik beschrieben bestimmt und unter Verwendung von Kontrollmessungen, die kein Propeptid enthielten, normiert. Die Graphik enthält die Ergebnisse zweier unterschiedlich langer Versuchsreihen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden.

Für die folgenden Renaturierungsexperimente wurde deshalb festgelegt, dass der Propeptidabbau mit 20  $\mu\text{M}$  Pepsin bei pH 4,0 durch 10 Minuten Inkubation bei 30 °C erfolgt. Unter diesen Bedingungen ließ sich eine Wiederfindung von 50 bis 72 % der Ausgangsaktivität erzielen.

## 5.2 Optimierung der Renaturierungsbedingungen

Bei der Planung der folgenden Experimente wurde davon ausgegangen, dass die Rückfaltung von denaturiertem Cathepsin K zur funktionellen Struktur in Abwesenheit des Propeptids nicht oder nur sehr langsam erfolgt. Dafür sprachen die in der Einleitung ausführlich besprochenen Literaturbefunde (z.B. Yamamoto et al. 1999, Pietschmann et al. 2002) und eigene Vorversuche. Deshalb erfolgte die Optimierung der Renaturierungsbedingungen grundsätzlich in Anwesenheit von mikromolaren Konzentrationen an Cathepsin K-Propeptid.

Aufbauend auf Versuchen zur Optimierung der Renaturierungsbedingungen anderer Cathepsine, insbesondere Procathepsin S und Cathepsin S in der eigenen Arbeitsgruppe, und auf Literaturdaten zum Procathepsin K (D'Alessio 1998), galt es zahlreiche mögliche Einflussfaktoren zu untersuchen: TRIS- und Arginin-Konzentration, Redoxpuffersystem, pH-Wert, Salze und weiterer Zusätze wie Glycerol, Rohrzucker, Detergenzien (Lecithin, Chaps, Brij 35) und Guanidinhydrochlorid, sowie Propeptidkonzentration, Temperatur und Zeit. Aufgrund dieser Vielzahl an Einflussfaktoren musste schrittweise vorgegangen werden.

Dabei war zu beachten, dass einige Faktoren in ihrer Wirkung möglicherweise von der Wechselwirkung mit anderen abhängen. Aus Gründen der Praktikabilität wählte ich für solche Experimente meist zentral zusammengesetzte Pläne 2. Ordnung, deren Prinzip in der Methodik ausführlich beschrieben ist. Dadurch war es möglich, mit nur einem Versuch mehrere Einflussfaktoren und deren Wechselwirkungen zu erfassen. Der experimentelle Ablauf war folgendermaßen: Das Enzym wurde, wie in den Methoden beschrieben, denaturiert. Danach wurden die Renaturierungsmedien mit den jeweiligen Zusätzen entsprechend dem Versuchsplan hergestellt. Der Start der Renaturierung erfolgte durch 1:100 Verdünnung von reduzierend denaturiertem Cathepsin K mit diesen Medien. Während der Renaturierung wurden zu bestimmten Zeiten Aliquots entnommen und bis zum Versuchsende bei -80°C aufbewahrt. Die Messung der Cathepsin K-Aktivität erfolgte unmittelbar nach dem Clearing, das grundsätzlich unter den ermittelten optimalen Bedingungen stattfand: 10 Minuten Inkubation mit 20 µM Pepsin bei pH 4,0 und 30 °C. Das Clearing wurde durch Zugabe des Testmediums zur Aktivitätsbestimmung beendet. Danach erfolgte die kinetische Messung der Produktbildung mit dem Mikrotiterplattenfluorometer Spectra Max Gemini.

### 5.2.1 Einfluss der TRIS-, Arginin-, GSH- und GSSG-Konzentration sowie des pH-Wertes auf die Renaturierungsausbeute

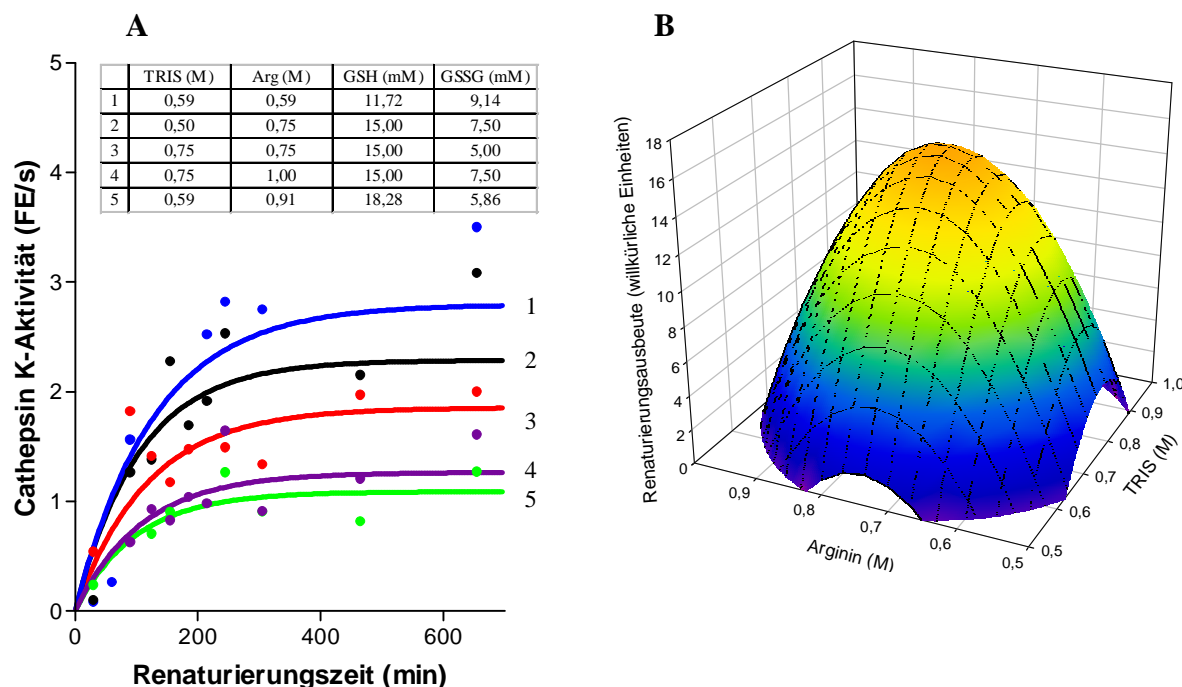
Als Erstes wurde die Prüfung der Wirkungen und Wechselwirkungen von fünf Faktoren geplant, deren zentrale Bedeutung für die Renaturierung anderer Cysteinproteasen schon bekannt war.

TRIS-Puffer bewirkt nicht nur eine Stabilisierung des pH-Wertes. TRIS und Arginin sind zusammen mit anderen Aminogruppen-tragenden Substanzen auch in der einschlägigen Literatur häufig zitierte Zusätze zur Verbesserung der Renaturierungsausbeute (Rudolph et al. 1997). Der positive Einfluss ist nicht eindeutig zu begründen. Wahrscheinlich beruht er zum Teil auf einer Auflockerung fehlgefalteter Strukturen vor allem durch die destabilisierende Wirkung der Guanidinogruppe des Arginins.

Reduziertes (GSH) und oxidiertes Glutathion (GSSG) bilden ein geeignetes Redoxsystem, das die Lösung inkorrekt ausgebildeter Disulfidbrücken (Disulfid-Reshuffling) erleichtert. Es war bereits bei der Cathepsin S-Renaturierung in der eigenen Arbeitsgruppe erfolgreich eingesetzt worden.

In der Literatur wird empfohlen, die Renaturierung unter leicht alkalischen Bedingungen durchzuführen, da die SH-Gruppe von Cystein einen  $pK_a$ -Wert von 8,6 hat und beim Disulfidreshuffling das Thiolat-Anion die reagierende Spezies ist. Andererseits durften keine pH-Werte über 9,5 eingestellt werden, da Proteine und insbesondere lysosomale Proteasen in diesem Bereich bereits instabil sind. Für die ersten Experimente wurde deshalb pH 8,0 gewählt.

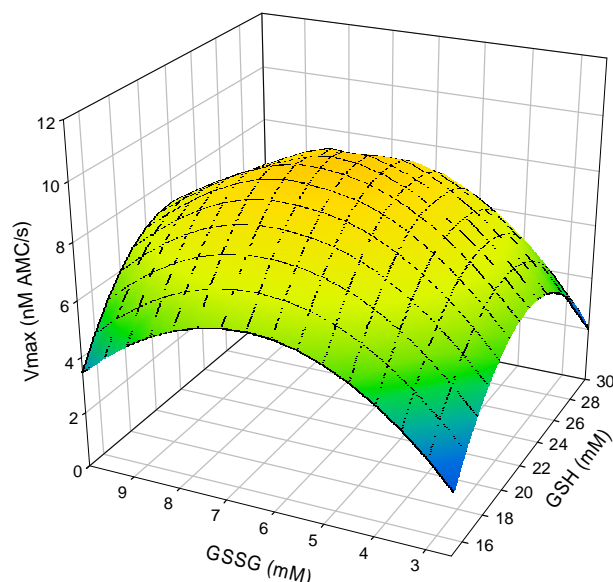
Die gewählten Konzentrationsbereiche für die fünf Faktoren überdeckten jeweils die Optima, die aus orientierenden Vorversuchen mit Cathepsin K oder aus Versuchen in der eigenen Arbeitsgruppe mit anderen Cathepsinen bekannt waren. Es sollten 0,1 – 1 M TRIS, 0 – 1 M Arginin, 10 – 20 mM GSH, 5 – 10 mM GSSG und zwei Renaturierungstemperaturen von 16 °C und 22 °C kombiniert werden.



**Abbildung 6: Einfluss der TRIS- und Arginin-Konzentration auf die Ausbeute bei der Propeptid-katalysierten Cathepsin K-Renaturierung.** Nach einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung wurden die fünf folgenden Faktoren variiert: 0,5 – 1 M TRIS, 0,5 – 1 M Arginin, 10 – 20 mM GSH, 5 – 10 mM GSSG und 16 und 22 °C Renaturierungstemperatur. Konstant blieben die Konzentration an Cathepsin K (5,05 nM), Propeptid (1,34 µM), EDTA (2mM) und der pH-Wert (8,0). Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 22 Stunden. Die Enzymaktivität wurde nach unterschiedlichen Zeiten in Aliquots, wie in der Methodik beschrieben bestimmt. Es ist nur ein Teil der bei 16 °C Renaturierungstemperatur gemessenen Daten dargestellt. *Abbildung 6A* zeigt den Zeitverlauf des Wiederauftretens von Cathepsin K-Aktivität nach 1:100 Verdünnung von denaturiertem Cathepsin K mit fünf verschiedenen Renaturierungsmedien, deren Unterschiede die eingefügte Tabelle zeigt. Dargestellt sind die Messwerte bis 11 Stunden Renaturierungszeit, da zu diesem Zeitpunkt alle Kurven bereits einen stabilen Endwert erreicht hatten. *Abbildung 6B* zeigt die nach dem in der Methodik beschriebenen Verfahren berechnete Wirkfläche für den Einfluss von TRIS und Arginin auf die Renaturierungsausbeute. Die Berechnung der Ausbeute erfolgte mit der in der Methodik angegebenen Gleichung 3 aus Zeitverläufen, wie sie in *Abbildung 6A* in Ausschnitten dargestellt ist.

Die Abhängigkeit der wiedergefundenen Cathepsin K-Aktivität von der Renaturierungszeit unter ausgewählten Bedingungen ist beispielhaft in *Abbildung 6A* dargestellt. Alle Kurven erreichen während des Beobachtungszeitraumes einen stabilen Endwert, der durch nichtlineare Regression nach Gleichung 3 berechnet wurde und im Folgenden als Renaturierungsausbeute bezeichnet wird. *Abbildung 6B* zeigt die Renaturierungsausbeute als Funktion der TRIS- und Arginin-Konzentration im Renaturierungsmedium. Das Optimum der Wirkfläche liegt bei einer TRIS-Konzentration von 0,914 M und einer Arginin-Konzentration von 0,75 M. Das Experiment wurde in gleicher Weise bei 16 °C und 22 °C Renaturierungstemperatur durchgeführt. Bei 16 °C wurden etwas höhere Aktivitäten, aber eine ähnliche Wirkfläche wie bei 22 °C gefunden, deshalb ist nur das

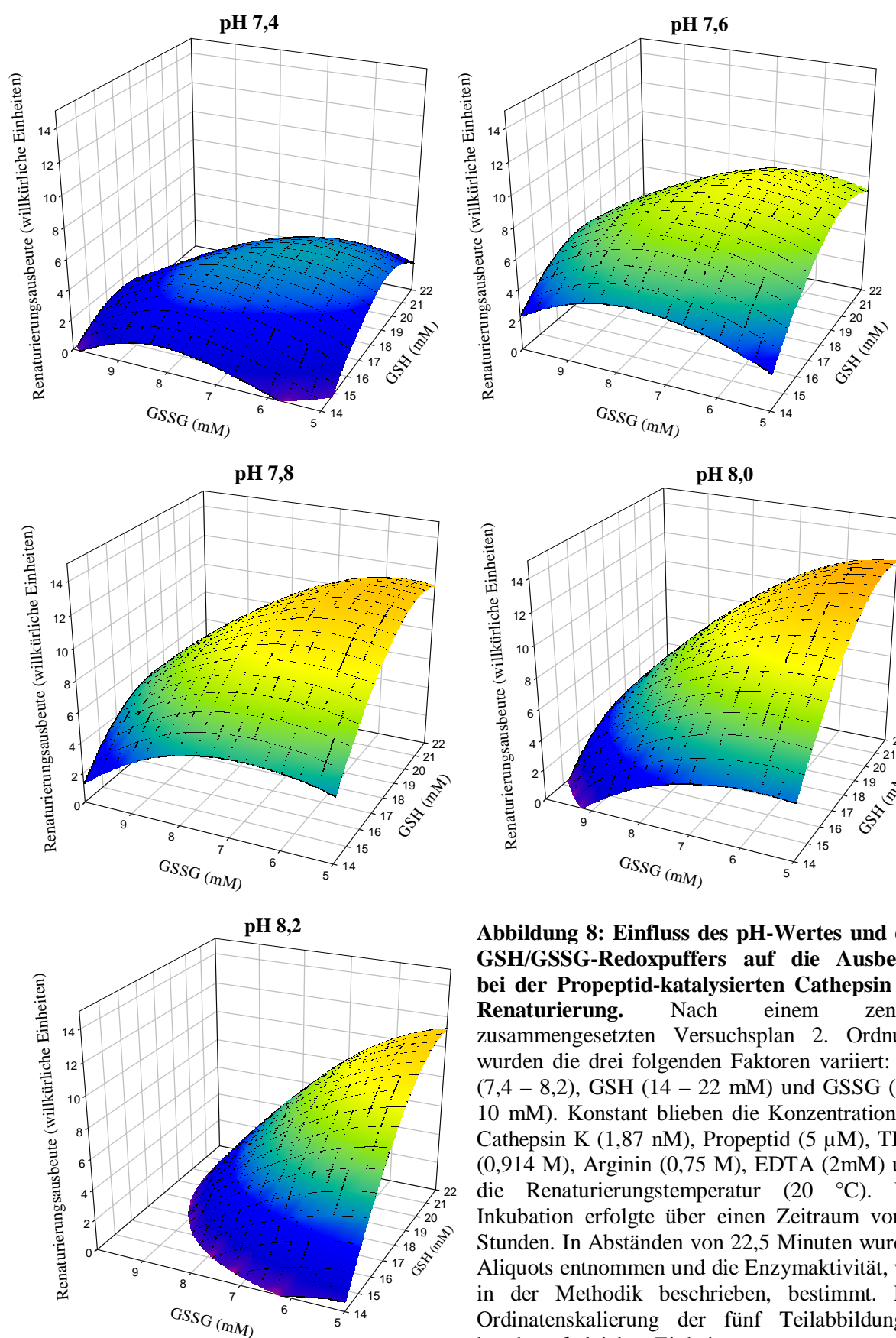
Ergebnis bei 16 °C dargestellt. Für GSH und GSSG waren in diesem Experiment keine Optimalwerte auszumachen. Das lag an den zu eng gewählten Grenzen des jeweils untersuchten Konzentrationsbereiches. Das wurde beim folgenden Versuch, der auf den eben beschriebenen Ergebnissen aufbaute, verändert. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis.



**Abbildung 7: Einfluss der GSH- und GSSG-Konzentration auf die Ausbeute bei der Propeptid-katalysierten Cathepsin K-Renaturierung.** Nach einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung wurden die zwei folgenden Faktoren variiert: 15 – 30 mM GSH und 2,5 – 10 mM GSSG. Konstant blieben die Konzentration an Cathepsin K (0,93 nM), Propeptid (5 µM), TRIS (0,914 M), Arginin (0,75 M), EDTA (2mM), der pH-Wert (8,0) und die Renaturierungstemperatur (20 °C). Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 200 Minuten. In Abständen von 25 Minuten wurden Aliquots entnommen und die Enzymaktivität, wie in der Methodik beschrieben bestimmt.

Man erkennt für beide Faktoren eine nichtlineare Abhängigkeit, die optimalen Konzentrationen liegen bei 6,6 mM GSSG und 22,2 mM GSH. Bei GSH ist die Abhängigkeit geringer als beim GSSG. Da dieser Versuch erst nach den Experimenten zur Optimierung der Renaturierungstemperatur stattfand, konnte die optimale Temperatur von 20 °C schon berücksichtigt werden.

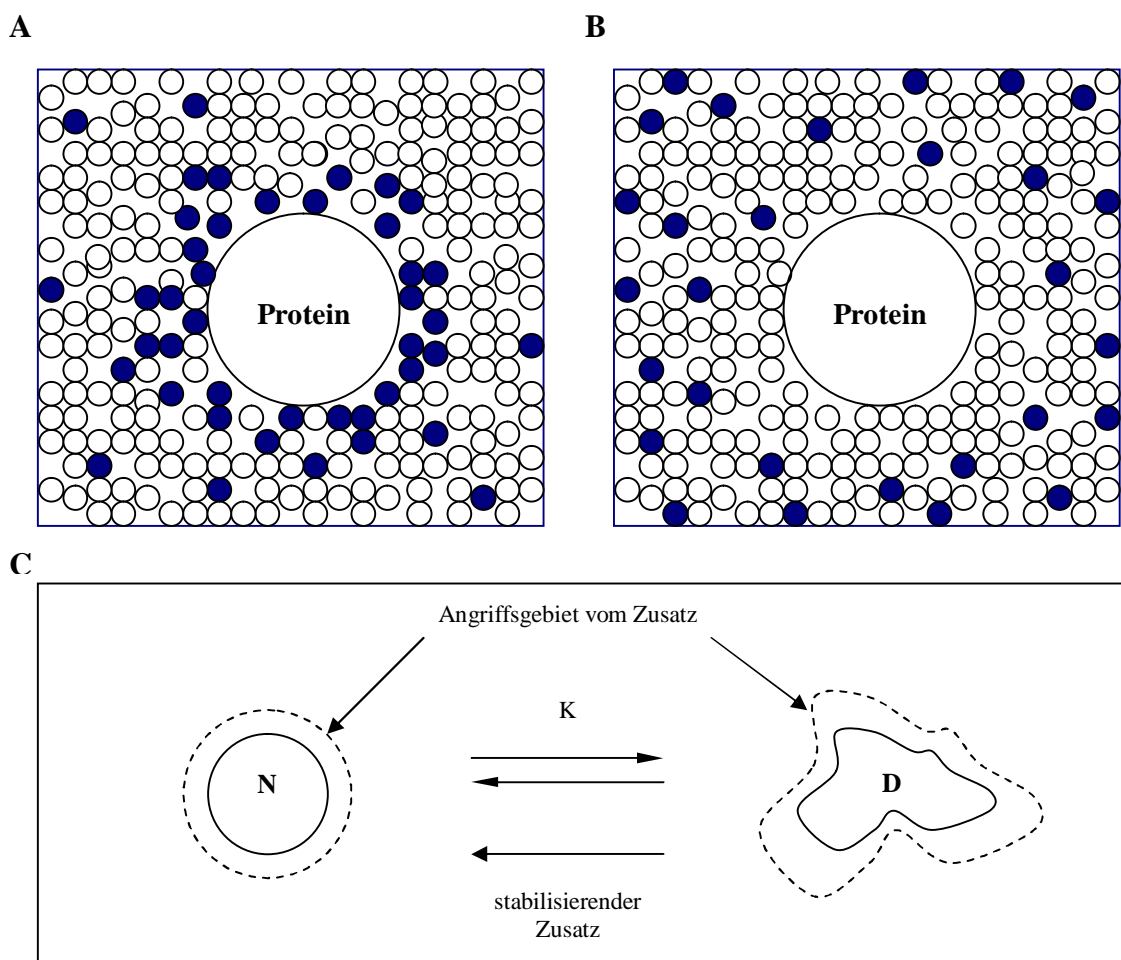
Als fünften Faktor untersuchte ich den Einfluss des pH-Wertes auf die Renaturierung. Dazu wurde Renaturierungsmedium auf fünf verschiedene pH-Werte eingestellt, die den leicht basischen Bereich abdeckten: pH 7,4, 7,6, 7,8, 8,0 und 8,2. Außerdem wurden die GSH- (14 - 22 mM) und die GSSG-Konzentration (5 - 10 mM) nochmals untersucht, um eine mögliche Wechselwirkung zwischen pH und der Redoxpufferkonzentration zu erfassen. Abbildung 8 zeigt einen deutlichen Einfluss des pH auf die Lage der GSH- und GSSG-Optima, mit steigenden pH wird die optimale GSH-Konzentration größer, beim GSSG ist es umgekehrt. Vergleicht man die Wiederfindung ergibt sich ein leichtes Optimum bei pH 8,0. Es befindet sich im Bereich der schon bekannten optimalen GSH- und GSSG-Konzentrationen.



**Abbildung 8: Einfluss des pH-Wertes und des GSH/GSSG-Redoxpuffers auf die Ausbeute bei der Propeptid-katalysierten Cathepsin K-Renaturierung.** Nach einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung wurden die drei folgenden Faktoren variiert: pH (7,4 – 8,2), GSH (14 – 22 mM) und GSSG (5 – 10 mM). Konstant blieben die Konzentration an Cathepsin K (1,87 nM), Propeptid (5  $\mu$ M), TRIS (0,914 M), Arginin (0,75 M), EDTA (2mM) und die Renaturierungstemperatur (20 °C). Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 3 Stunden. In Abständen von 22,5 Minuten wurden Aliquots entnommen und die Enzymaktivität, wie in der Methodik beschrieben, bestimmt. Die Ordinatenkalierung der fünf Teilabbildungen beruht auf gleichen Einheiten.

### 5.2.2 Auswirkung der Anwesenheit von Salzen auf die Renaturierungsausbeute

Der erste Hinweis auf einen positiven Effekt anorganischer Salze auf die Renaturierungsausbeute von Cathepsin K war zufallsbedingt. Im Rahmen der Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit hatte ich ein Medium versehentlich mit HCl übertitriert und musste anschließend durch NaOH-Zugabe wieder den alkalischen pH einstellen. Im Mittel lag die Renaturierungsausbeute der vier mit diesem Medium angesetzten Proben um den Faktor 22 über den übrigen. Der Einfluss von Salzen auf den Renaturierungsvorgang beruht nach Literaturdaten (Timasheff und Arakawa 1997, Rudolph et al. 1997) auf der Wirkung als Stabilisator oder Destabilisator. Dies hängt vom Protein und von den Ionen ab aus denen sich das Salz zusammensetzt. Auch ungeladene Zusätze wie Glycerol, Glucose, Rohrzucker oder Polyethylenglykol können solche Effekte zeigen.



**Abbildung 9: Schema der Wechselwirkung eines Zusatzes mit dem Protein.** Der Zusatz neigt entweder dazu sich mit dem Protein oberflächlich zu verbinden (Abbildung 9A) oder sich nicht zu verbinden (Abbildung 9B). Dadurch kommt es zu unterschiedlichen Verteilungsmustern um das Protein herum. In allen Fällen ist der Zusatz bestrebt sich energetisch günstig zu verteilen. Dadurch unterstützt er die Bildung der nativen Struktur (N) des Proteins (Abbildung 9C), da im denaturierten Zustand (D) aufgrund der Entfaltung des Proteins und der damit verbundenen Oberflächenvergrößerung eine thermodynamisch ungünstige Situation entsteht. K bezeichnet die Massenwirkungs-Gleichgewichts-Konstante für die Entfaltungsreaktion. Die Idee zu diesen Abbildungen stammt aus der Literatur (Rudolph et al. 1997).



Die stabilisierende Wirkung solcher Zusätze beruht entweder auf ihrer Neigung sich mit dem Protein oberflächlich zu verbinden (Abbildung 9A) oder aus der das Protein umgebenden Hydrathülle ausgeschlossen zu werden (Abbildung 9B). Abbildung 9C zeigt die praktischen Konsequenzen für den Fall, dass der Zusatz vom Kontakt mit der Proteinoberfläche ausgeschlossen wird, das Protein also von einer reinen Hydrathülle umgeben ist. Bei der Denaturierung von Cathepsinen kommt es zur Entfaltung der nativen Struktur des Proteins und damit zur Zunahme der strukturellen Asymmetrie. Folglich vergrößert sich dabei die Oberfläche des Proteins und die Ungleichverteilung des jeweiligen Zusatzes nimmt zu. Diese Situation ist thermodynamisch ungünstig, so dass die Reaktion leichter zur linken Seite, also zur nativen Struktur des Proteins, begünstigt wird.

Daraufhin begann die systematische Prüfung des Einflusses von Salzen auf die Faltungsausbeute. Dabei wurden neben NaCl auch  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und  $\text{MgSO}_4$  untersucht. Ein Vorversuch zeigte, dass die Salze mit Sulfatanteil zu den höchsten Ausbeuten führten. Im Hauptversuch wurden diese beiden Salze dann in jeweils drei Konzentrationen eingesetzt:  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0,2 M, 0,4 M, 0,6 M) und  $\text{MgSO}_4$  (0,5 M, 0,7 M, 0,9 M), welche die aus dem Vorversuch geschätzten Optima abdeckten. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Man erkennt, dass  $\text{MgSO}_4$  besser als  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wirkt und das Optimum bei 0,7 M liegt.

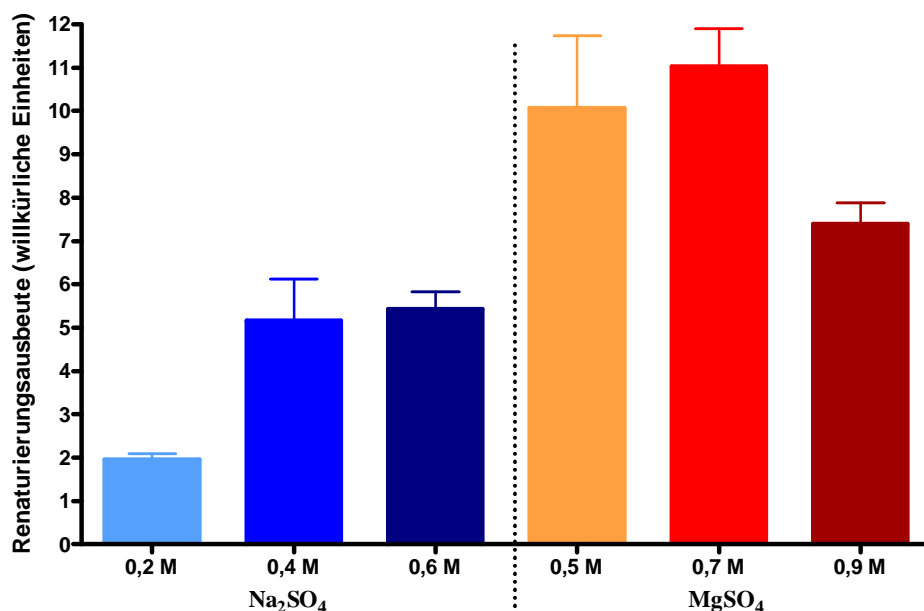
### 5.2.3 Untersuchung weiterer möglicher Einflussfaktoren

Zusätze aus unterschiedlichen Stoffklassen, für die entweder in der Literatur oder in der Arbeitsgruppe schon positive Effekte auf die Renaturierungsausbeute beschrieben wurden, habe ich erst einmal einzeln in jeweils zwei Konzentrationsstufen untersucht. Es handelte sich um drei Detergenzien, zwei Polyalkohole und ein chaotropes Salz, die in Tabelle 1 aufgelistet sind. Die eingesetzten Konzentrationen ergaben sich aus den Literaturempfehlungen. Renaturiert wurde in 0,914 M TRIS pH 8,0 / 0,75 M Arginin / 22,2 mM GSH / 6,6 mM GSSG / 0,7 M  $\text{MgSO}_4$  / 5  $\mu\text{M}$  Propeptid mit 0,64 nM Cathepsin K bei 20 °C über 12 Stunden.

Lecithin, Brij 35 und Chaps besetzen hydrophobe Oberflächenareale und können dadurch die Proteinaggregation reduzieren. Glycerol und Rohrzucker erhöhen die Oberflächenspannung, wie das in Abbildung 9 illustriert wird. Guanidinhydrochlorid löst beispielsweise hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken, wobei kovalente Bindungen (Disulfidbrücken) erhalten bleiben.



In den ersten Versuchen zu diesen sechs Faktoren wurde deutlich, dass alle drei Detergenzien keinen Einfluss auf die Renaturierungsausbeute hatten. Für Guanidinhydrochlorid fand sich ein Optimum von 197 mM. Damit bestätigte sich der positive Effekt von Guanidinogruppen auf die Renaturierungsausbeute, ähnlich wie das bereits beim Arginin beobachtet wurde.



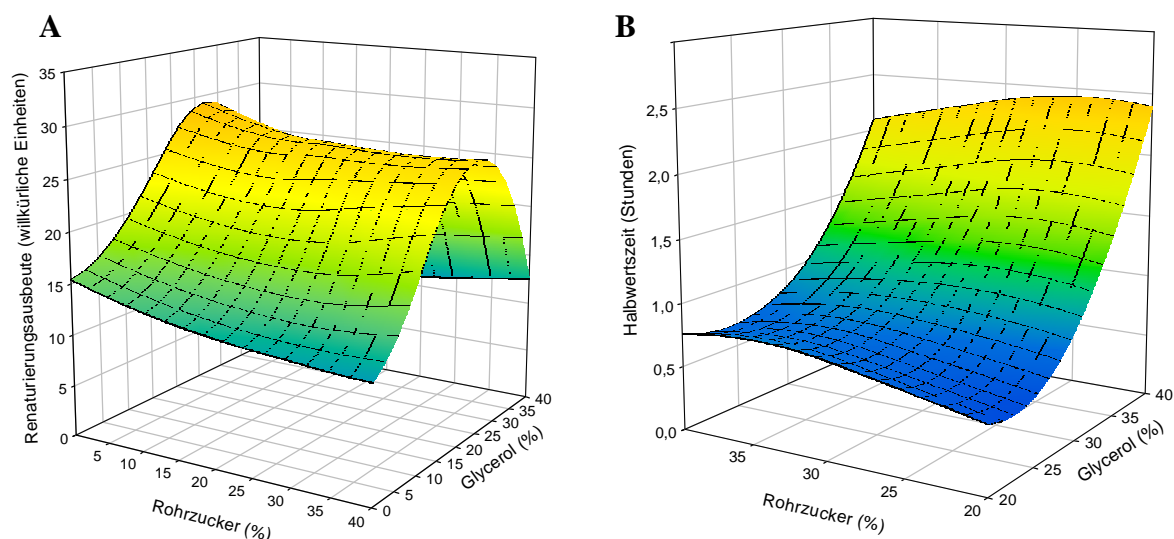
**Abbildung 10: Einfluss von Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und MgSO<sub>4</sub> auf die Ausbeute bei der Propeptid-katalysierten Cathepsin K-Renaturierung.** Nach einem einfachen faktoriellen Versuchsplan wurden Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 M, 0,4 M, 0,6 M) und MgSO<sub>4</sub> (0,5 M, 0,7 M, 0,9 M) variiert. Konstant blieben die Konzentration an Cathepsin K (6,22 nM), Propeptid (5 µM), TRIS (0,914 M), Arginin (0,75 M), GSH (22,2 mM), GSSG (6,6 mM), EDTA (2mM), der pH-Wert (8,0) und die Renaturierungstemperatur (16 °C). Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 3 Stunden. In Abständen von 1 Stunde wurden jeweils 3 Aliquots entnommen und die Enzymaktivität, wie in der Methodik beschrieben bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen nach 3 Stunden Renaturierungszeit, da zu diesem Zeitpunkt die gemessenen Ausbeuten maximal waren.

Die Ergebnisse mit Rohrzucker und Glycerol waren in den einfachen faktoriellen Versuchen nicht eindeutig, so dass ihr Einfluss in einem größeren Konzentrationsbereich mit einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung genauer untersucht wurde (Abbildung 11). Hierbei war festzustellen, dass Rohrzucker keinen wesentlichen Einfluss auf

**Tabelle 1: Einfluss von Substanzen aus unterschiedlichen Stoffklassen auf die Ausbeute bei der Propeptid-katalysierten Cathepsin K-Renaturierung**

Faktor	untersuchter Bereich		Einfluss	Optimum	Maßeinheit
	von	bis			
Lecithin	0,01	0,025	nein	-	%
Chaps	0	0,025	nein	-	%
Brij 35	0,01	0,025	nein	-	%
Glycerol	0	40	ja	23	%
Rohrzucker	0	40	nein	-	%
GndHCl	0	300	ja	197	mM

die Renaturierungsausbeute hat, dafür aber Glycerol. Die optimale Glycerolkonzentration liegt bei 23 %. Um zu prüfen, ob Rohrzucker möglicherweise einen positiven Effekt auf die Renaturierungsgeschwindigkeit hat, wurden auch die entsprechenden Halbwertszeiten berechnet und in Abbildung 11B dargestellt. Beide Teile von Abbildung 11 zeigen die Unabhängigkeit von der Rohrzuckerkonzentration.



**Abbildung 11: Einfluss von Rohrzucker und Glycerol auf die Ausbeute und Geschwindigkeit der Propeptid-katalysierten Cathepsin K-Renaturierung.** Nach einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan 2. Ordnung wurden die Konzentration von Rohrzucker (0 – 40 %) und Glycerol (0 – 40 %) variiert. Konstant blieben die Konzentration an Cathepsin K (0,64 nM), TRIS (0,914 M), Arginin (0,75 M), EDTA (2mM), der pH-Wert (8,0) und die Renaturierungstemperatur (20 °C). Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 12 Stunden. Die Enzymaktivität wurde nach unterschiedlichen Zeiten in Aliquots, wie in der Methodik beschrieben bestimmt. *Abbildung 11A* zeigt die nach dem in der Methodik beschriebenen Verfahren berechnete Wirkfläche für den Einfluss von Rohrzucker und Glycerol auf die Renaturierungsausbeute, *Abbildung 11B* die zugehörigen Halbwertszeiten.

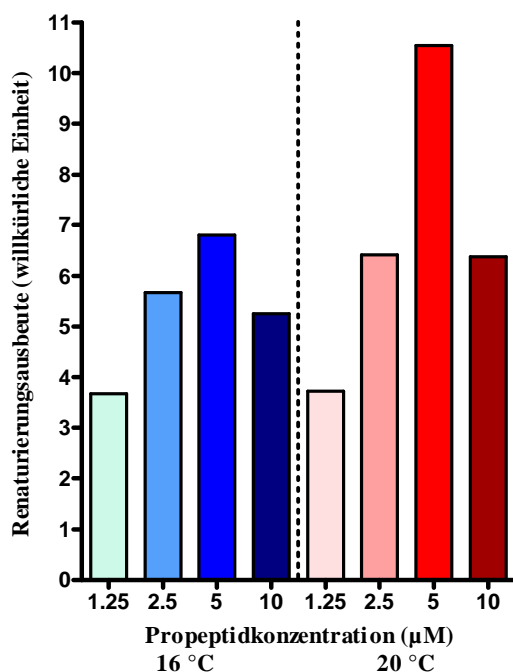
#### 5.2.4 Einfluss von Propeptidkonzentration und Temperatur auf Geschwindigkeit und Ausmaß der Renaturierung

Die Propeptid-katalysierte Renaturierung von denaturiertem Cathepsin K ist eine bimolekulare Reaktion und folglich ist eine Abhängigkeit von der Konzentration der Reaktionspartner und der Temperatur zu erwarten. Nach allgemeinen Erfahrungen sollte die Konzentration an denaturiertem Protein sehr gering gehalten werden, um die Aggregation von Faltungsintermediaten zu reduzieren. Im vorliegenden Fall ergab sich die Enzymkonzentration im Renaturierungsansatz aus der Nachweisgrenze des fluorometrischen Aktivitätstests. Je nach Renaturierungsausbeute wurden 0,373 bis 9,335 nM Cathepsin K

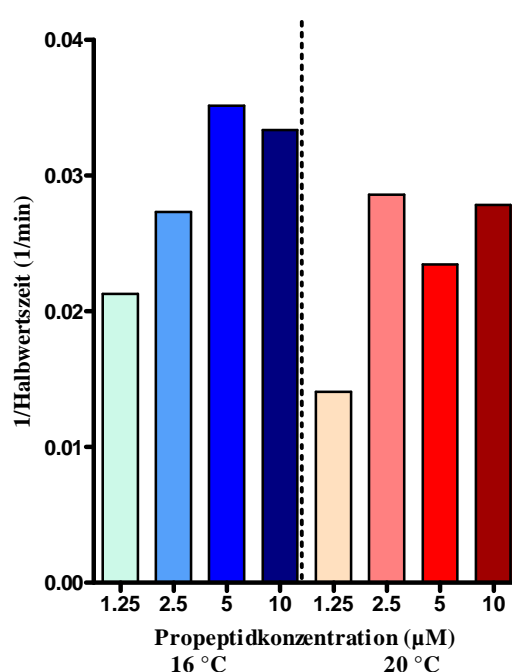
eingesetzt. Das ist weit unterhalb der in der Literatur angegebenen Konzentration von 800 nM, die zur Vermeidung von Aggregationen nicht überschritten werden sollte (Rudolph et al. 1997).

Ansteigende Konzentrationen an Propeptid sollten theoretisch den Renaturierungsvorgang bis zu einem Sättigungswert beschleunigen, ähnliches ist von einer Temperaturerhöhung zu erwarten, denn in beiden Fällen nimmt die Kollisionswahrscheinlichkeit zwischen den Reaktanten zu. Da eine Temperaturerhöhung aber gleichzeitig auch hydrophobe Interaktionen verstärkt, die unter Umständen zur Ausfällung von Proteinpräzipitaten führen können, sind einer Temperaturerhöhung Grenzen gesetzt. Eine absolute Obergrenze für die Temperatur ergibt sich durch die thermische Denaturierung von Proteinen. Ein bewährter Temperaturbereich für Renaturierungsexperimente sind 10 bis 25 °C (Rudolph et al. 1997). Es wurden Propeptid-Konzentrationen von 1,25 bis 10 µM und ein Temperaturintervall von 12 bis 24 °C untersucht.

#### A Ausbeute



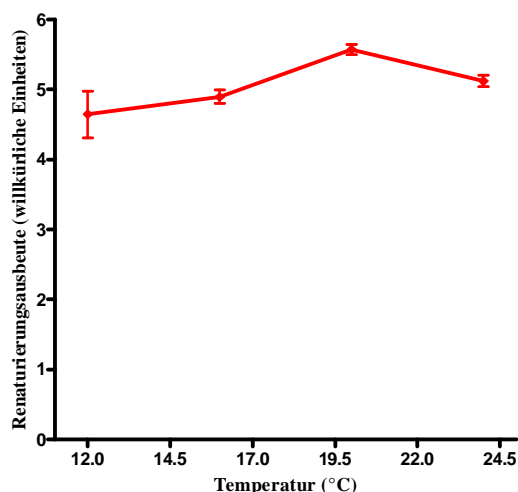
#### B Geschwindigkeit



**Abbildung 12: Einfluss von Propeptidkonzentration und Temperatur auf die Ausbeute und Geschwindigkeit der Propeptid-katalysierten Cathepsin K-Renaturierung.** Nach einem einfachen faktoriellen Versuchsplan wurden zwei Faktoren variiert: Propeptidkonzentration (1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM) und Renaturierungstemperatur (16 °C und 20 °C). Konstant blieben die Konzentration an Cathepsin K (1,87 nM), TRIS (0,914 M), Arginin (0,75 M), GSH (22,2 mM), GSSG (6,6 mM), EDTA (2mM) und der pH-Wert (8,0). Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 3 Stunden. In Abständen von 30 Minuten wurden jeweils Aliquots entnommen und die Enzymaktivität, wie in der Methodik beschrieben, bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen bei den jeweils unter den Balken angegebenen Bedingungen.

Abbildung 12 zeigt den Einfluss der Propeptid-Konzentration auf den Renaturierungsverlauf bei 16 und 20 °C. Bezüglich der Renaturierungsausbeute ist bei beiden Temperaturen ein klares Optimum bei 5 µM Propeptid zu erkennen (Abbildung 12A), bei der Halbwertszeit ist das allenfalls bei 16 °C angedeutet (Abbildung 12B). Zweifelsfrei ist aber, dass bei der geringsten Propeptidkonzentration die Halbwertszeit am größten d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit am geringsten ist. Das stimmt gut mit der eingangs erläuterten Theorie überein.

Weiterhin ist in Abbildung 12 zu sehen, dass bei 20 °C die Ausbeute deutlich höher ist als bei 16 °C Renaturierungstemperatur. Dieses Ergebnis wurde in einem weiteren Versuch nochmals genauer untersucht. Dabei erfolgte die Inkubation bei 12 °C, 16 °C, 20 °C und 24 °C (Abbildung 13). Wie im vorangegangenen Versuch zur Optimierung der Propeptid-Konzentration bestätigte sich das Optimum bei 20 °C. Die Temperaturabhängigkeit ist aber vergleichsweise gering, so dass auch die bei 16 °C gewonnenen Daten verwertbar bleiben.



**Abbildung 13: Einfluss der Temperatur auf die Ausbeute der Propeptid-katalysierten Cathepsin K-Renaturierung.** Nach einem einfachen faktoriellen Versuchsplan wurden zwei Faktoren variiert: Renaturierungstemperatur (12 °C, 16 °C, 20 °C, 24 °C) und pH-Wert (7,7, 7,9, 8,1). Konstant blieben die Konzentration an Cathepsin K (1,87 nM), TRIS (0,914 M), Arginin (0,75 M), GSH (22,2 mM), GSSG (6,6 mM) und EDTA (2mM). Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 3 Stunden. In Abständen von 22,5 Minuten wurden Aliquots entnommen und die Enzymaktivität, wie in der Methodik beschrieben, bestimmt. Die Variation des pH-Wertes begründet sich auf der Tatsache, dass dieser Versuch vor den Untersuchungen zur Optimierung des pH-Wertes stattfand. Mittels Konstruktion einer Wirkfläche war es aber möglich, die Werte für den optimalen pH-Wert von 8,0 zu errechnen.

### 5.2.5 Zusammenfassung der Versuche zur Optimierung der Renaturierungsbedingungen

Für die Propeptid-katalysierte Renaturierung von Cathepsin K sind die in Tabelle 2 zusammengestellten Bedingungen optimal, man sollte also in einem Medium dieser Zusammensetzung bei 20 °C mindestens 2 Stunden inkubieren.

**Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Optimierung der Renaturierungsbedingungen**

Faktor	untersuchter Bereich		Optimum	Maßeinheit
	von	bis		
<b>TRIS</b>	0,1	1	0,914	M
<b>Arginin</b>	0	1	0,75	M
<b>GSH</b>	0	30	22,2	mM
<b>GSSG</b>	0	10	6,6	mM
<b>pH-Wert</b>	7,4	8,78	8,0	
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0	1,25	0,7	M
<b>GndHCl</b>	0	300	197	mM
<b>Glycerol</b>	0	40	23	%
<b>Propeptid</b>	0	10	5	μM
<b>Renaturierungstemperatur</b>	0	25	20	°C
<b>Renaturierungszeit</b>	0	22	mindestens 2	h

Eine interessante Größe bei solchen Experimenten ist die Renaturierungsausbeute. Da meine Versuche mit der Denaturierung von aktivem Cathepsin K begannen, war eine Berechnung der Renaturierungsausbeute durch einen Vergleich der Enzymaktivitäten zwischen dem renaturierten und dem anfangs eingesetzten Enzym verhältnismäßig einfach möglich. Unter Berücksichtigung der im Versuch verwirklichten Gesamtverdünnung errechnete ich unter den gefundenen optimalen Bedingungen eine maximale Renaturierungsausbeute von 44 %. Berücksichtigt man noch die unvermeidlichen Verluste an Enzymaktivität beim Clearing (Vergleich Abbildung 3) ergeben sich tatsächliche Ausbeuten zwischen 60 und 90 %. Damit habe ich im Vergleich zu publizierten Ergebnissen einen guten Wert erzielt. Die Untersuchungen zur Optimierung der Renaturierungsbedingungen wurden somit erfolgreich abgeschlossen, die Untersuchungen zur Spezifität der Foldasewirkung des Cathepsin K-Propeptids schließen sich an.

### 5.3 Prüfung der Spezifität der Foldasewirkung des Cathepsin K-Propeptids

Die Charakterisierung von Propeptid-katalysierten Faltungsvorgängen wirft die Frage nach der Spezifität des Faltungskatalysators auf. Da Propeptide, wie schon ausführlich erwähnt, auch potente Inhibitoren der jeweiligen Mutterenzyme sind, ist durchaus auch eine mittelbare, d.h. indirekte Wirkung durch die Stabilisierung von spontan renaturiertem Enzym denkbar. Diesbezügliche Experimente mit synthetischen Inhibitoren habe ich in der Literatur zwar nicht gefunden, bei manchen Enzymen wurden aber Substrate oder natürliche Effektoren schon erfolgreich als Faltungshilfen eingesetzt (Ghelis und Yon 1982). Zur Prüfung der

Spezifität führte ich zwei Versuchsreihen durch, zum einen mit niedermolekularen Peptidinhibitoren und zum anderen mit fremden, aber inhibierenden Propeptiden.

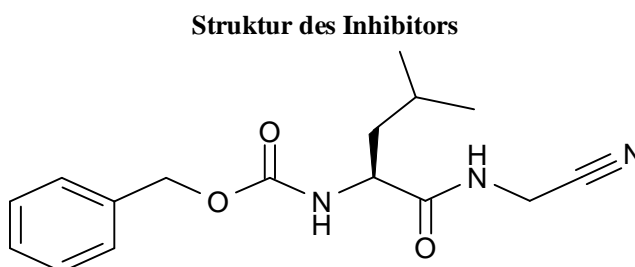
### 5.3.1 Einsatz von Peptidinhibitoren

In den vergangenen Jahren wurden Dipeptid-Nitril-Inhibitoren in ihrer Wirksamkeit gegenüber lysosomalen Cysteinproteasen geprüft. Sie lagern sich ins aktive Zentrum von Cathepsinen ein und reagieren reversibel mit dem Cysteinrest im katalytischen Zentrum (Hanzlik et al. 1986, Gütschow et al. 2001). Die Affinität dieser Inhibitoren für Cathepsin K und Cathepsin S liegt im nano- bis mikromolaren Bereich. Basierend auf den Ergebnissen der entsprechenden Inhibitionsstudien nutzten wir diejenigen Inhibitoren mit der höchsten Affinität zu dem jeweiligen Enzym (Löser, unveröffentlichte Ergebnisse). Untersucht wurde ihr Einfluss auf die Renaturierung von denaturiertem Cathepsin K und Cathepsin S.

**Tabelle 3: Vergleich der Struktur der Cathepsin K- und Cathepsin S-Inhibitoren**

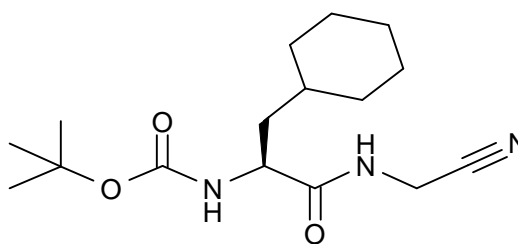
#### RL060 gegenüber Cathepsin K

$K_i = 35 \text{ nM}$



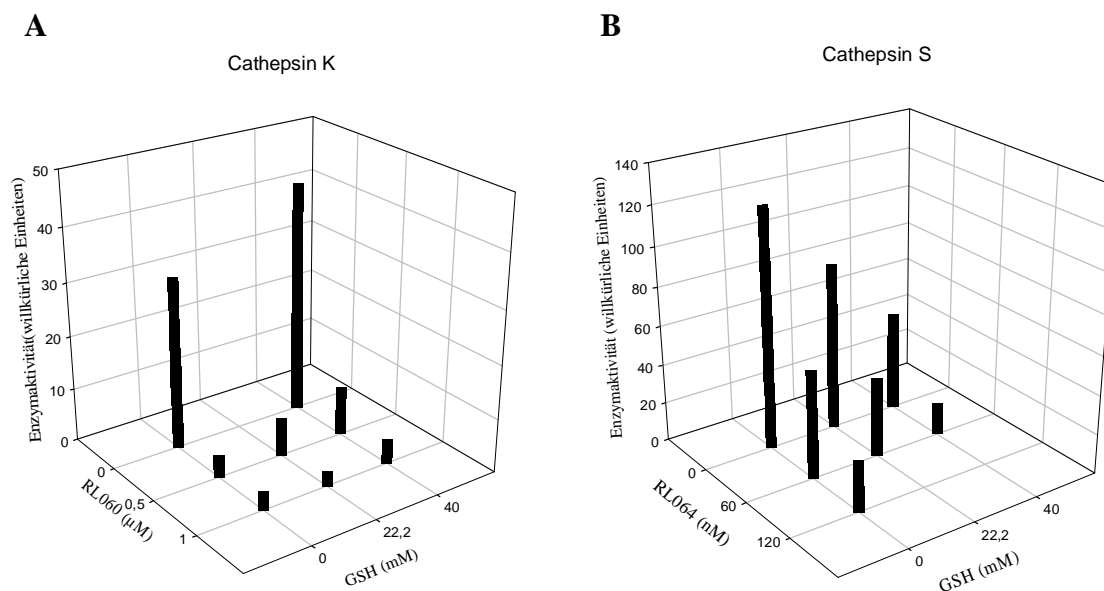
#### RL064 gegenüber Cathepsin S

$K_i = 40 \text{ nM}$



Um sicher zu sein, dass die vergleichsweise hohe Konzentration an GSH im Renaturierungsmedium durch Reaktion mit der Nitril-Gruppe nicht zur Inaktivierung der Inhibitoren führt, wurden Vorversuche zur Quantifizierung der Hemmwirkung in Gegenwart von DTT, Cystein und GSH durchgeführt. Abbildung 14 zeigt einen Teil der Ergebnisse. Bei beiden Enzymen ist die Hemmung durch den jeweils effektivsten Peptidinhibitor offensichtlich. Selbst bei 40 mM GSH konnte kein dramatischer Wirkungsverlust festgestellt werden. Auch bei längerer Inkubation, 1 Stunde lang wurde beobachtet, ist kein Wirkungsverlust der Inhibitoren zu beobachten. Damit sind diese beiden Dipeptid-Nitrile

geeignete Werkzeuge, um nach einer Pseudo-Foldasewirkung von niedermolekularen Inhibitoren zu suchen. Ein interessanter Nebenbefund war, dass GSH in dieser hohen Konzentration von 40 mM bei Cathepsin K eine Steigerung der Aktivität bewirkt, bei Cathepsin S ist das Gegenteil zu beobachten, dem wurde aber nicht nachgegangen.



**Abbildung 14: Einfluss von Dipeptid-Nitril-Inhibitoren und GSH auf die Enzymaktivität.** Die Messungen der Enzymaktivitäten erfolgte in Mikrotiterplatten unter Verwendung der in der Methodik jeweils angegebenen Medien, denen die aus den Graphiken ersichtlichen Konzentrationen an GSH und Inhibitor zugesetzt wurden. Beide Nitril-inhibitoren wurden aus Stammlösungen zugesetzt, die unter Verwendung von DMSO hergestellt wurden. Zur Standardisierung der Reaktionsbedingungen wurde deshalb durch DMSO-Zusatz in allen Ansätzen eine einheitliche Endkonzentration von 6 % bei Cathepsin K bzw. 1,4 % bei Cathepsin S realisiert. Da DTT die Wirksamkeit der Inhibitoren möglicherweise hätte vermindern können, wurde es bei den Messansätzen weggelassen. Die Aktivierung der Enzyme erfolgte durch Zugabe von 5 mM DTT zu den jeweiligen Arbeitsverdünnungen. Die Endkonzentrationen im Test lagen beim Cathepsin K bei 0,37 nM und beim Cathepsin S bei 0,68 nM, das sind 1,6 % der Konzentration im jeweiligen Aktivierungsansatz. Damit ist die DDT-Konzentration im Test vernachlässigbar gering. Die Beobachtungszeit betrug 1 Stunde, dargestellt sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen der Anfangsgeschwindigkeiten der Produktbildung.

Die für die Beantwortung der Fragestellung nach der Spezifität der Foldasewirkung des Propeptids entscheidenden Experimente sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Denaturiertes Enzym wurde unter den jeweils optimalen Renaturierungsbedingungen mit sättigenden Konzentrationen des jeweils angegebenen Inhibitors 5 Stunden lang inkubiert. Es wurden Aliquots entnommen, 1:30 mit Testmedium verdünnt, so dass das Substrat die geringe Restkonzentration an Inhibitor weitgehend vom aktiven Zentrum verdrängen konnte.

Die in Tabelle 4 aufgeführten Kontrollmessungen mit nativem Enzym zeigen, dass auf diese Weise 89 % (Cathepsin K) bzw. 84 % (Cathepsin S) der eingesetzten Enzymaktivität gemessen werden können. Wird unter vergleichbaren Bedingungen mit denaturierten Enzymen gearbeitet, findet man über den gesamten Beobachtungszeitraum keine messbaren Enzymaktivitäten. Das belegt zum einen, dass die Geschwindigkeit der Spontanrenaturierung von reifem Cathepsin K und Cathepsin S sehr gering ist und zum anderen, dass die Foldasewirkung der Propeptide etwas eigenständiges, also nicht einfach eine Folge von deren Hemmwirkung ist.

**Tabelle 4: Einfluss der Dipeptid-Nitril-Inhibitoren auf die Renaturierung von Cathepsin K und Cathepsin S**

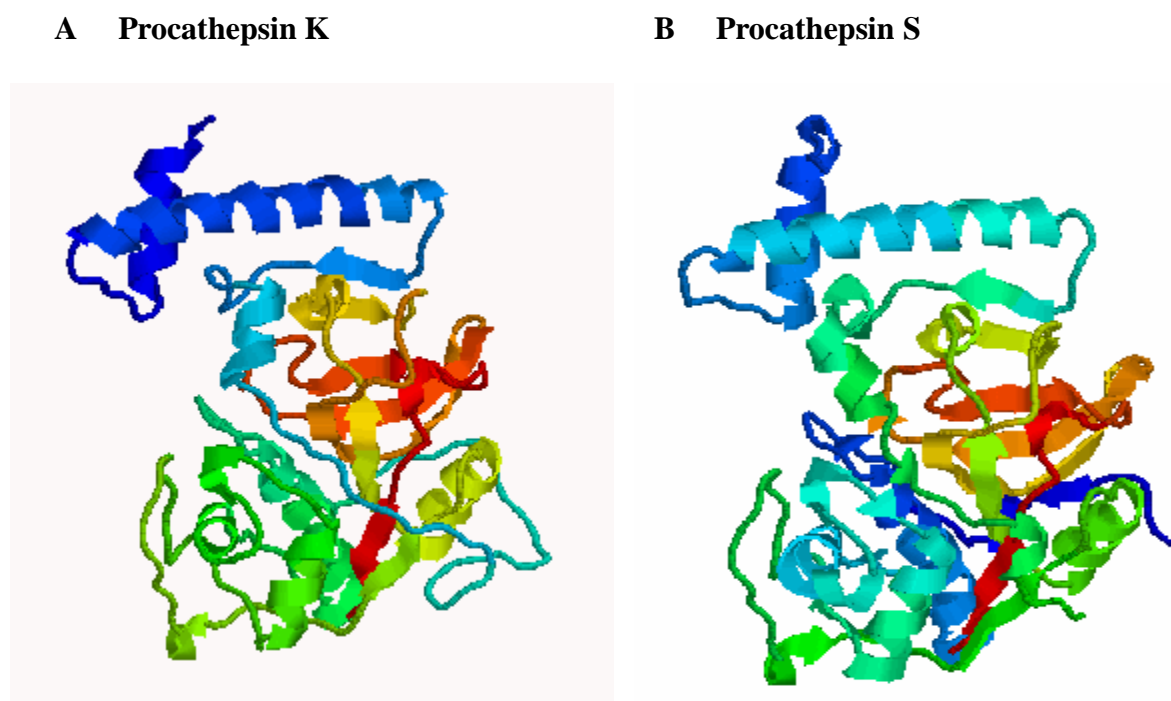
Enzym		Inhibitor		Aktivität
Bezeichnung	Zustand	Bezeichnung	Konzentration	(%)
Cathepsin K	nativ	-	0	100
		RL 060	1 $\mu$ M	89
	denaturiert	$K_i = 0,035 \mu\text{M}$	1 $\mu$ M	0
			2 $\mu$ M	0
			0	0
Cathepsin S	nativ	-	0	100
		RL 064	0,12 $\mu$ M	84
	denaturiert	$K_i = 0,040 \mu\text{M}$	0,12 $\mu$ M	0
			0,24 $\mu$ M	0
			0	0

### 5.3.2 Nachweis der Spezifität der Propeptid-katalysierten Faltung von Cathepsin K und Cathepsin S

Aus der eben gezeigten Wirkungslosigkeit niedermolekularer Peptidinhibitoren auf die Renaturierung von zwei nahe verwandten Cysteinproteasen kann geschlossen werden, dass vermutlich die Größe und Struktur der jeweils aus ca. 100 Aminosäuren bestehenden Propeptide der beiden untersuchten Enzyme für die Foldasfunktion entscheidend sind. Die Primärstruktur der beiden gentechnisch hergestellten Propeptide ist bekannt, die Homologie



beträgt 58 %. Bezüglich der Sekundär- und Tertiärstruktur könnte man vermuten, dass es zumindest Ähnlichkeiten mit der Struktur der Proregion in den entsprechenden Zymogenen gibt, die aus Röntgenstrukturuntersuchungen bekannt sind (Coulombe et al. 1996, LaLonde et al. 1999, Kaulmann 2004). Abbildung 15 zeigt die beiden Zymogene im Vergleich.

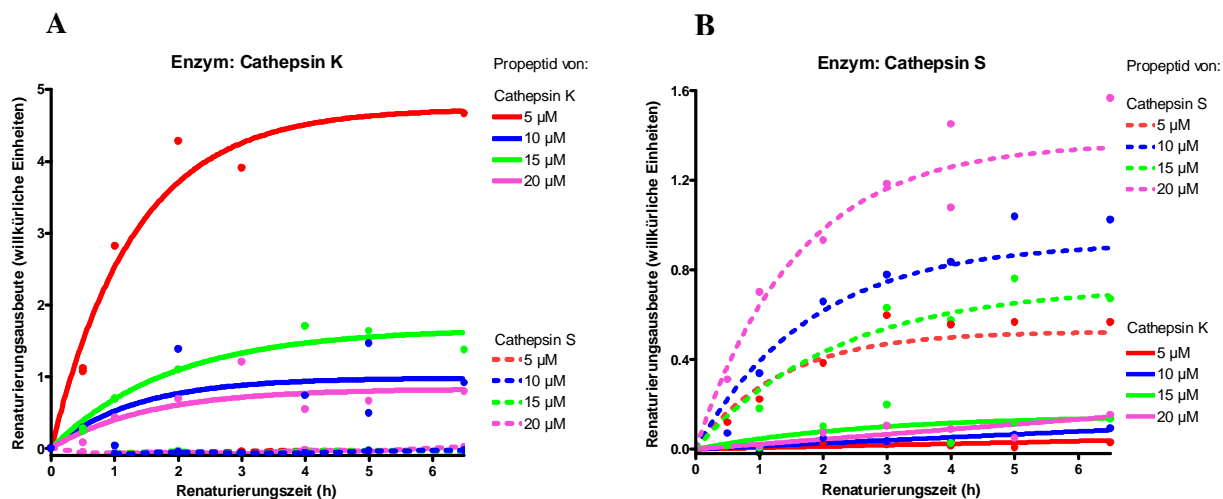


**Abbildung 15: Vergleich der Struktur von Procathepsin K und Procathepsin S.** Die Cartoons wurden mit dem Programm Rasmol erstellt. Die Daten für Procathepsin K stammen aus der Prot Datenbank (Eintrag 1BY8, LaLonde et al. 1999), die für Procathepsin S sind bisher noch nicht öffentlich zugänglich (Kaulmann 2004).

Man erkennt allenfalls Unterschiede im Detail. Gerade deshalb erschien es interessant, die Foldasewirkung beider Propeptide auf das jeweils andere Enzym zu untersuchen. Daher wurde im folgenden Versuch unter den für Cathepsin K optimierten Renaturierungsbedingungen die Wirkung der Propeptide von Cathepsin K und Cathepsin S in Konzentrationen von 5 bis 20  $\mu\text{M}$  auf die Rückfaltung von Cathepsin K (Abbildung 16A) und von Cathepsin S (Abbildung 16B) verglichen.

Es wird eindeutig die Spezifität der beiden Propeptide für ihr Enzym nachgewiesen, da nur bei den Proben Aktivitäten gemessen werden konnten, in denen das jeweilige Enzym mit seinem eigenen Propeptid versetzt worden war. Die anderen Proben, wo die beiden Cathepsine mit dem jeweils anderen Propeptid versetzt wurden, ergaben keine (Abbildung 16A) bzw. nur minimale Aktivitäten (Abbildung 16B). Durch den Einsatz vier verschiedener Propeptid-Konzentrationen war es möglich, die bisher gefundenen Optima, von 5  $\mu\text{M}$

Propeptid bei Cathepsin K und 20  $\mu\text{M}$  Propeptid bei Cathepsin S, zu bestätigen. Für die unterschiedlichen optimalen Propeptid-Konzentrationen für Cathepsin K und Cathepsin S haben wir bisher keine Erklärung.



**Abbildung 16: Nachweis der Spezifität der Foldasewirkung der Propeptide von Cathepsin K und S gegenüber ihren Mutterenzymen.** Denaturiertes Cathepsin K (0,93 nM) und Cathepsin S (0,68 nM) wurden jeweils mit beiden Propeptiden (K — , S ----) in getrennten Ansätzen renaturiert. Die Propeptidkonzentrationen betrugen: 5 (rot), 10 (blau), 15 (grün) und 20  $\mu\text{M}$  (rosa). Die Zusammensetzung des Renaturierungsmediums ist in der Methodik angegeben. Aus den Aliquots, die dem Renaturierungsansatz entnommen wurden, wurden die zugesetzten Propeptide durch Pepsin-Clearing nach dem jeweils optimalen Verfahren eliminiert. Entsprechend dem verwendeten Enzym wurden auch unterschiedliche Testmedien zur Aktivitätsmessung eingesetzt. Alle Abläufe sind in der Methodik detailliert dargestellt.

Unter Berücksichtigung der im Versuch verwirklichten Gesamtverdünnung errechnete ich für Cathepsin S eine maximale Renaturierungsausbeute von 10,5 %. Im Vergleich zu Cathepsin K (44 %) ist das weniger als ein Viertel.

## 6 Diskussion

Die Proregionen der Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen fungieren in erster Linie als Inhibitoren der proteolytischen Aktivität ihrer eigenen Mutterenzyme. Dadurch können sie verhindern, dass es während der Biosynthese der Proteasen zu einer unerwünschten Proteolyse kommt. Erst auf dem Weg ins Lysosom, dem physiologischen Wirkbereich, findet aufgrund des sinkenden pH-Wertes die autokatalytische Abspaltung der Proregion statt, wodurch es zur Prozessierung des Zymogens zum aktiven Enzym kommt. Auch für die Propeptide, wie Proregionen im freien, nicht-kovalenten Zustand bezeichnet werden, konnte gezeigt werden, dass sie zur hochaffinen Hemmung ihrer jeweiligen Mutterenzyme in der Lage sind (Mason et al. 1987, Fox et al. 1992, Li et al. 1995, Volkel et al. 1996, Maubach et al. 1997, Nomura und Fujisawa 1997, Visal et al. 1998, Billington et al. 2000, Guay et al. 2000).

Neben der inhibierenden Funktion sind die Proregionen auch an der Zielsteuerung der Cysteinproteasen während der Biosynthese beteiligt (McIntyre et al. 1994, Chapman et al. 1997, Nissler et al. 1998). Außerdem bewirken sie eine Enzymstabilisierung, was bei Untersuchungen zur Lebensdauer von Enzym-Propeptid-Komplexen im Vergleich zu freien Proteasen festgestellt werden konnte (Mason et al. 1987, Nomura und Fujisawa 1997). Worauf diese Stabilisierung jedoch zurückzuführen ist, wurde dabei noch nicht geklärt. Einerseits könnte allein die Inhibition der proteolytischen Aktivität und damit die Unterbindung der intermolekularen autokatalytischen Degradation für die verlängerte Lebensdauer verantwortlich sein. Andererseits könnten aber auch andere Aspekte in Frage kommen z.B. eine Strukturstabilisierung.

In den vergangenen 10 Jahren wurde in einigen Untersuchungen eine weitere Funktion der Proregionen von Cathepsin L-ähnlichen Endopeptidasen diskutiert, die einer Faltungshilfe für das reife Enzym (Tao et al. 1994). Man spricht auch von intramolekularer Chaperonfunktion und neuerdings von Foldasen (Baneyx und Palumbo 2003). Das bedeutet, dass die Proregionen für die korrekte Faltung ihrer Mutterenzyme verantwortlich sind. Ein direkter Beweis erfolgte *in vitro* bisher nur für Cathepsin L und S (Yamamoto et al. 1999, Pietschmann 2002). Die Vermutung, dass die Proregion von Cathepsin K auch diese Funktion hat, beruht auf der nahen Verwandtschaft zu Cathepsin L und S (Inaoka, Bilbe et al. 1995, Bossard, Tomaxzek et al. 1996, Lecaille, Kaleta et al. 2002) und auf der Publikation einer genetischen Defektkrankheit, bei der eine Punktmutation in der Proregion von Cathepsin K zum Funktionsausfall des Enzyms führte (Hou et al. 1999). Cathepsin K ist aber *in vivo* im Gegensatz zum Cathepsin S glycosyliert.

Die eigenen Voruntersuchungen und Erfahrungen zur Propeptid-katalysierten Renaturierung von Cathepsin S (Pietschmann 2002) und die Verfügbarkeit der für die analogen Experimente mit Cathepsin K notwendigen Biochemikalien (Brömme und Okamoto 1995, Schlabrakowski 2003) führten direkt zum Thema meiner Arbeit: Wie spezifisch ist die Foldasefunktion der Propeptide der Cathepsine K und S? Zuerst war es notwendig optimale Bedingungen und Messmethoden für die einzelnen Schritte der Renaturierung von Cathepsin K zu finden. Dazu gehörte vor allem die Renaturierung des Cathepsin K-Propeptid-Komplexes, aber auch die Denaturierung von Cathepsin K, die Entfernung des inhibitorischen Propeptids und die Messung der Cathepsin K-Aktivität. Die Aktivitätsmessung ist das sicherste Verfahren zum Nachweis der Wiederherstellung der Struktur eines Enzyms, also der erfolgreichen Renaturierung (Rudolph et al. 1997). Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte mittels fluorometrischer Messung der AMC-Abspaltung von synthetischen Peptidsubstraten. Dieses Verfahren ist sehr gut praktikabel, gleichzeitig hochempfindlich und wurde speziell für Cathepsin K im Rahmen einer Promotionsarbeit (Kleint 2004) optimiert. Auch bei der Messung der Cathepsin S-Aktivität konnte ich ein erprobtes Protokoll nutzen (Maubach et al. 1997). Meine Aufgabe bestand darin, beide Tests an die Messung großer Probenzahlen in Mikrotiterplatten anzupassen. Nach dem erfolgreichen Abschluss dieser Versuche musste ich die Entfernung des inhibitorischen Propeptids durch Pepsinverdau (Clearing) so gestalten, dass möglichst zuverlässig eine hohe Wiederfindung der Enzymaktivität erreicht wird, denn nur in Abwesenheit des Propeptids ist die Messung der Cathepsin K-Aktivität und damit der Nachweis der erfolgreichen Renaturierung möglich (Kleint 2004). In den letzten Jahren wurden einige Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Cathepsin K publiziert, bei denen das entsprechende Zymogen erfolgreich mit Pepsin zum reifen Enzym prozessiert wurde (Linnevers et al. 1997, Hou et al. 1999, Brömme et al. 2004). Das waren zwar wertvolle Hinweise zur prinzipiellen Machbarkeit, aber eine einfache Übernahme der für präparative Zwecke konzipierten Methoden für meine analytische Fragestellung war nicht möglich. Nach meinem Kenntnisstand ist ein routinesicheres Verfahren zur Zerstörung inhibitorischer Propeptide bei einer großen Zahl von Proben bisher noch nicht beschrieben worden. Durch systematische Variation von Pepsin-Konzentration, Temperatur und Clearing-Zeit fand ich Bedingungen, die nach vollständiger Hemmung des Enzyms durch ansteigende Propeptidkonzentrationen zur Wiederfindung von 50 bis 72 % der Ausgangsaktivität führten.

Diese Vorarbeiten waren die Voraussetzung für den experimentell umfangreichsten Teil meiner Arbeit – die Optimierung der Renaturierungsbedingungen. Anlehnend an

Versuche der eigenen Arbeitsgruppe zu Procathepsin S und Cathepsin S und auf Literaturdaten zum Procathepsin K (D'Alessio 1998), galt es folgende mögliche Einflussfaktoren zu untersuchen: TRIS- und Arginin-Konzentration, Redoxpuffersystem, pH-Wert, Salze und weitere Zusätze wie Glycerol, Rohrzucker, Lecithin, Chaps, Brij 35 und Guanidinhydrochlorid, Propeptidkonzentration, Renaturierungstemperatur und -zeit. Die gegenwärtigen Vorstellungen über die physiko-chemischen Wirkungen der einzelnen Faktoren bei der Proteinrenaturierung habe ich schon an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil erwähnt. Meine Ergebnisse stehen prinzipiell im Einklang mit der Theorie und mit den bisher veröffentlichten Untersuchungen zur Renaturierung von Procathepsin K. Das betrifft beispielsweise den positiven Effekt von Arginin, der sich in meinen *trans*-Experimenten ebenso zeigte wie in den publizierten *cis*-Ansätzen (D'Alessio 1998). In der folgenden Tabelle werden die optimalen Bedingungen für die *cis*-Renaturierung der Procathepsine L, S und K mit den Ergebnissen meiner *trans*-Experimente mit Cathepsin K und seinem Propeptid verglichen. Einen entscheidenden Beitrag zu der hohen Ausbeute von 60 bis 90 % in meinen Experimenten leistete neben dem Arginin und TRIS (Abbildung 6) das  $\text{MgSO}_4$  (Abbildung 10). Dieses Salz war bei der Procathepsin K-Renaturierung nicht mit getestet worden (D'Alessio 1998), beim Procathepsin S hat es keinen positiven Effekt (Kramer 2005).

**Tabelle 5: Vergleich der optimalen Renaturierungsbedingungen von der *cis*-Renaturierung der Procathepsine L, S und K mit der *trans*-Renaturierung von Procathepsin K**

Faktor	Optimum				Maßeinheit
	Cathepsin L	Cathepsin S	Cathepsin K	<i>trans</i> Cathepsin K	
TRIS	192	1000	50	914	mM
Arginin	0	1000	700	750	mM
GSH	8,35	20	10	22,2	mM
GSSG	7,4	10	1	6,6	mM
pH-Wert	8,2	8	8	8	
$\text{MgSO}_4$	240	0	-	700	mM
GndHCl	0	0	-	197	mM
Glycerol	0	0	-	23	%
Propeptid		entfällt		5	$\mu\text{M}$
Renaturierungstemperatur	19	16	Raumtemperatur	20	°C
Renaturierungszeit	3	24	ca. 16	mindestens 2	h
EDTA	2	2	5	2	mM
Brij 35	0,07	0	-	0	%
Literaturzitat	(Paul in Vorbereitung)	(Kramer 2005)	(D'Alessio (1997))	(eigene Versuche)	

Man erkennt, dass einige Parameter, wie beispielsweise die Temperatur und der pH nur geringfügig schwanken, andere aber, wie TRIS, Arginin, GSH, GSSG,  $\text{MgSO}_4$ , GndHCl,

Glycerol und die Renaturierungszeit sich erheblich unterscheiden. Da D'Alessio und Mitarbeiter TRIS lediglich als pH-Puffer verwendet haben, also den Einfluss einer höheren Konzentration nicht prüften, könnte man vermuten, dass bei den nahe verwandten Cathepsinen K und S TRIS und Arginin in etwa molarer Konzentration sowohl die *cis*- als auch die *trans*-Renaturierung verbessern. Das ist beim Cathepsin L grundsätzlich anders, hier konnte die Ausbeute vor allem durch den Zusatz des Detergenz Brij 35 gesteigert werden. Als Redoxsystem wurde in allen Fällen GSH und GSSG verwendet. Auch hier unterscheidet sich die für Cathepsin L gefundenen optimalen Konzentration deutlich von den übrigen. Bei der *cis*-Renaturierung von Cathepsin K waren 10 mM GSH und 1 mM GSSG die höchsten geprüften Konzentrationen, so dass die Differenz zu den Ergebnissen aus dem eigenen Labor zufällig sein könnte (D'Alessio et al. 1998).

Für die *trans*-Renaturierung von Cathepsin K war der Zusatz von Glycerol, welches die native Konformation stabilisiert (Vergleich Abbildung 9) und von Guanidinhydrochlorid, welches nicht-kovalente Bindungen lockert, beispielsweise falsch verknüpfte Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen, vorteilhaft.

Unter den gefundenen optimalen *trans*-Renaturierungsbedingungen für Cathepsin K konnte ich eine maximale Renaturierungsausbeute von 44 % erzielen. Wenn man bedenkt, dass es beim Clearing zu unvermeidlichen Verlusten der Enzymaktivität kommt (Abbildung 5), liegen die tatsächlichen Ausbeuten sogar zwischen 60 und 90 %. Damit habe ich bei der *trans*-Renaturierung von Cathepsin K ein Ergebnis erreicht, dass etwas über dem für *cis*-Bedingungen in der Literatur publizierten Werten liegt (D'Alessio et al. 1998).

Die hohe Ausbeute war bei der *trans*-Renaturierung von Cathepsin K günstig für die Bearbeitung einer völlig neuen Fragestellung im Zusammenhang mit der Foldasewirkung von Propeptiden – nämlich der nach ihrer Spezifität. Es ist ja vorstellbar, dass aufgrund der inhibitorischen Wirkung der Propeptide ein mittelbarer Effekt auf die Renaturierung entsteht, d.h. es könnte auch indirekt die Stabilisierung von spontan renaturiertem Enzym durch Komplexbildung mit dem Propeptid zu einer Verlagerung des Massenwirkungsgleichgewichtes führen und so das beobachtete Ergebnis bewirken. Um dies zu klären, führte ich eine Versuchsreihe mit niedermolekularen Peptidinhibitoren durch. Als Hemmstoffe boten sich in der Literatur beschriebene Dipeptid-Nitril-Inhibitoren an, die reversibel mit dem Cysteinrest im aktiven Zentrum von Cathepsinen reagieren (Hanzlik et al. 1986, Gütschow et al. 2001). Die Experimente erfolgten gleichzeitig mit Cathepsin K und Cathepsin S, da kein großer Mehraufwand entstand, aber die Aussagekraft durch den Vergleich zweier Enzyme wesentlich gesteigert werden konnte. Es wurden jeweils diejenigen

Inhibitoren mit der höchsten Affinität zu dem jeweiligen Enzym eingesetzt (Löser, unveröffentlichte Ergebnisse). Dabei liegt die Affinität dieser Inhibitoren für Cathepsin K und Cathepsin S im nano- bis mikromolaren Bereich. In Vorversuchen wurde die Wirksamkeit der Inhibitoren an den nativen Enzymen geprüft und gleichzeitig ausgeschlossen, dass durch die Anwesenheit von GSH, Cystein oder DTT im Renaturierungsmedium die Inhibitoren aufgrund einer Reaktion mit der Nitril-Gruppe inaktiviert werden (Abbildung 14). Bei der Messung habe ich berücksichtigt, dass diese Inhibitoren nicht durch Pepsin entfernt werden können, sondern durch ausreichende Verdünnung im Testmedium konkurrenzlos gegenüber einem Überschuss an Substrat gemacht werden müssen. Der Versuch ergab ein absolut eindeutiges Ergebnis (Tabelle 4): die Dipeptid-Nitril-Inhibitoren im Renaturierungsansatz sind wirkungslos es war keinerlei Enzymaktivität zu beobachten. Das Funktionieren des Tests habe ich durch Positivkontrollen mit nativem Enzym bewiesen. Der Versuch wurde zweimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt. Dieses Versuchsergebnis zeigte sozusagen als ungeplanten Nebenfund, dass die Geschwindigkeit der Spontanrenaturierung der reifen Cathepsine K und S sehr gering ist. Damit ist eindeutig bewiesen, dass sowohl Cathepsin K als auch Cathepsin S Propeptide zur Ausbildung ihrer aktiven Konformation brauchen und deren Foldasewirkung etwas eigenständiges, also nicht nur eine Folge von deren Hemmwirkung ist.

Dieses Ergebnis warf sofort die nächste Frage auf: Ist die Foldasefunktion der Propeptide nur auf das jeweilige Mutterenzym gerichtet, gibt es also eine absolute Spezifität? Aufgrund der geringen strukturellen Unterschiede von Cathepsin K und Cathepsin S erschien es besonders interessant gerade bei diesen beiden Enzymen die Renaturierung mit ihrem eigenen als auch mit dem jeweils fremden Propeptid zu beobachten. Die Experimente wurden unter den für das jeweilige Enzym optimalen Testbedingungen durchgeführt (Abbildung 16). Nur bei jenen Proben konnten Aktivitäten gemessen werden, wo das jeweilige Enzym mit seinem eigenen Propeptid versetzt worden war. Die Proben mit dem fremden Propeptid ergaben keine oder nur minimale Ausbeuten. Damit ist die Spezifität der beiden Propeptide für ihr Enzym eindeutig nachgewiesen. Eine solche Spezifität ist bezüglich der Inhibitionswirkung nicht beobachtet worden. Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse entsprechender Versuche (Schlabrakowski 2003).

**Tabelle 6: Dissoziationskonstanten ( $K_i$ -Werte) für die Wechselwirkung der Propeptide K und S mit den Cathepsinen K und S (Schlabrakowski 2003).**

Cathepsin	K <sub>i</sub> -Werte (nM)	
	Propeptid	
	K	S
K	0,35 ± 0,073	0,7 ± 0,003
S	0,057 ± 0,026	0,05 ± 0,005

Das ist ein weiterer Beleg für die Unabhängigkeit von Foldase- und Inhibitorfunktion. Solche Untersuchungen sind bisher noch nie durchgeführt worden, so dass ein Vergleich mit Literaturdaten nicht möglich ist. In der eigenen Arbeitsgruppe sind, aufbauend auf meinen Ergebnissen, analoge Untersuchungen mit weiteren Cathepsinen in Arbeit.



## 7 Literaturverzeichnis

Atley LM, Mort JS, Lalumiere M, Eyre DR. 2000. Proteolysis of human bone collagen by cathepsin K: characterization of the cleavage sites generating by cross-linked N-telopeptide neoepitope. *Bone*, 26(3):241-7.

Baici A und Gyger-Marazzi M. 1982. The slow, tight-binding inhibition of Cathepsin B by leupeptin. *Eur J Biochem*, 129: 33-41.

Baneyx F und Palombo JL. 2003. Improving heterologous protein folding via molecular chaperone and foldase co-expression. *Methods Mol Biol*, 205:171-97.

Barrett AJ, Kembhavi AA, Brown MA, Kirschke H, Knight CG, Tamai M, Hanada K. 1982. L-*trans*-Epoxysuccinyl-leucylamino(4-guanidino)butane (E64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsin B, H, and L. *Biochem J*, 201:189-198.

Billington CJ, Mason P, Magny MC, Mort JS. 2000. The Slow-Binding Inhibition of Cathepsin K by Its Propeptide. *Bioch Biophys Res Comm*, 276:924-929.

Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA. 1996. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem*, 271(21):12517-24.

Brömme D und Okamoto K. 1995. Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution. *J Biol Chem*, 376(6):379-84.

Brömme D, Nallaseth FS, Turk B. 2004. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods*, 32(2):199-206.

Chapman RL, Kane SE, Erickson AH. 1997. Abnormal glycosylation of procathepsin L due to N-terminal point mutations correlates with failure to sort to lysosomes. *J Biol Chem*, 272(13):8808-16.

Coulombe R, Grochulski P, Sivaraman J, Menard R, Mort JS, Cygler M. 1996. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J*, 15(20):5492-503.

D'Alessio KJ, McQueney MS, Brun KA, Orsini MJ, Debouck CM. 1998. Expression in *Escherichia coli*, Refolding, and Purification of Human Procathepsin K, an Osteoclast-Specific Protease. *Protein Expr Purif*, 15:123-220.

Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G, Gowen M. 1996. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem*, 271(21):12511-6.

Fox T, de Miguel E, Mort JS, Storer AC. 1992. Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochem*, 31(50):12571-6.

Fujita Y, Nakata K, Yasui N, Matsui Y, Kataoka E, Hiroshima K, Shiba R, Ochi T. 2000. Novel mutations of the cathepsin K gene in patients with pycnodysostosis and their characterization. *J Clin Endocrin Metab*, 85(1):425-31.

Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, Foged NT, Delmas PD, Delaisse JM. 1998. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem*, 273(48):32347-52.

Gelb BD, Shi GP, Chapman HA, Desnick RJ. 1996. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*, 273(5279):1236-8.

Ghelis C und Yon J. 1982. Protein folding. London: Academic Press.

Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavarria M, Bertoncello I, Drake F, Zavarselk S, Tellis I, Hertzog P, Debouck C, Kola I. 1999. Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res*, 14(10):1654-63.

Guay J, Falgout J, Ducret A, Percival MD, Mancini A. 2000. Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. *Eur J Biochem*, 267.

Gütschow M und Powers JC. 2001. 2-Alkylthio-4-oxo-3-quinazolineacetonitriles and Analogous Thieno[3,2-d]pyrimidineacetonitriles: Reaction with Thiols via Trapped Thioimidates. *J Org Chem*, 66:4723-4727.

Hou WS, Brömme D, Zhao Y, Mehler E, Dushey C, Weinstein H, Miranda CS, Fraga C, Greig F, Carey J, Rimoin DL, Desnick RJ, Gelb BD. 1999. Characterization of novel cathepsin K mutations in the pro and mature polypeptide regions causing pycnodysostosis. *J Clin Invest*, 103(5):731-8.

Hou WS, Li Z, Gordon RE, Chan K, Klein MJ, Levy R, Keysser M, Keyszer G, Brömme D. 2001. Cathepsin K is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *Am J Pathol*, 159(6):2167-77.

Inaoka T, Bilbe G, Ishibashi O, Tezuka K, Kumegawa M, Kokubo T. 1995. Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Bioch Biophys Res Comm*, 206(1):89-96.

Kafienah W, Bromme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. 1998. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Eur J Biochem*, 331(Pt 3):727-32.

Karrer KM, Peiffer SL, DiTomas ME. 1993. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci*, 90(7): 3063-7.

Kaulmann G. 2004. The crystal structure of human procathepsin S wild type [Dissertation]. Jena: Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität.

Kleint R. 2004. Analyse von Cathepsin K-Ligand-Wechselwirkungen: Vorarbeiten zur Untersuchung der Propeptid-katalysierten Faltung dieses Enzyms [Dissertation]. Jena: Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität.

Kojima S, Minagawa T, Miura K. 1998. Tertiary Structure Formation in the Propeptide of Subtilisin BPN' by Successive Amino Acid Replacements and its Close Relation to Function. *J Mol Biol*, 277:1007-1013.

Kolkhorst V, Sturzebecher J, Wiederanders B. 1998. Inhibition of tumor cell invasion by protease inhibitor: correlation with the protease profile. *J. Cancer Res. Clin. Oncologie*, 124 (11):598-606.

Kreusch S, Fehn M, Maubach G, Nissler K, Rommerskirch W, Schilling K, Weber E, Wenz I, Wiederanders B. 2000. An evolutionarily conserved tripartite tryptophan motif stabilizes the prodomains of cathepsin L-like cysteine proteases. *Eur J Biochem*, 267:2965-2972.

LaLonde JM, Zhao B, Janson CA, D'Alessio KJ, McQueney MS, Orsini MJ, Debouck CM, Smith WW. 1999. The crystal structure of human procathepsin K. *Biochem*, 38(3):862-9.

Lecaille F, Kaleta J, Bromme D. 2002. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev*, 102(12):4459-88.

Li Y, Hu Z, Jordan F, Inouye M. 1995. Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants. *J Biol Chem*, 270(42):25127-32.

Linnevers CJ, McGrath ME, Armstrong R, Mistry FR, Barnes MG, Klaus JL, Palmer JT, Katz BA, Brömme D. 1997. Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex. *Prot Sci*, 6(4):919-21.

Mason RW, Gal S, Gottesman MM. 1987. The identification of the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L. *Eur J Biochem*, 248(2):449-54.

Maubach G, Schilling K, Rommerskirch W, Wenz I, Schultz JE, Weber E, Wiederanders B. 1997. The inhibition of cathepsin S by its propeptide--specificity and mechanism of action. *Eur J Biochem*, 250(3):745-50.

McIntyre GF, Godbold GD, Erickson AH. 1994. The pH-dependent membrane association of procathepsin L is mediated by a 9-residue sequence within the propeptide. *J Biol Chem*, 269(1):567-72.

Hanzlik RP, Zygmunt J, Moon JB. 1986. Reversible covalent inhibition of Papain by a peptide nitrile. *Am Chem Soc*, 108:1350-1351.

Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, Villadangos JA, Ploegh H, Peters C, Rudensky AY. 1998. Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science*, 280:450-53.

Nick Pace C und Scholtz JM. 1997. *Folding Proteins. Protein Structure*. T. E. Creighton. New York: Oxford University Press.

Nissler K, Kreusch S, Rommerskirch W, Strubel W, Weber E, Wiederanders B. 1998. Sorting of non-glycosylated human procathepsin S in mammalian cells. *J Biol Chem*, 379(2):219-24.

Nomura T und Fujisawa Y. 1997. Processing properties of recombinant human procathepsin L. *Bioch Biophys Res Comm*, 230(1):143-6.

Pietschmann S, Fehn M, Kulmann G, Wenz I, Wiederanders B, Schilling K. 2002. Foldase function of the cathepsin S proregion is strictly based upon its domain structure. *J Biol Chem*, 383(9):1453-8.

Pietschmann S. 2002. Die Foldasefunktion des Propeptids des humanen Cathepsin S [Dissertation]. Jena: Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität.

Rasch D, Verdooren LR, Gowers JJ. 1999. *Grundlagen der Planung und Auswertung von Versuchen und Erhebungen*. München Wien: Oldenburg Verlag.

Rudolph R, Böhm G, Lilie H, Jaenicke R. 1997. *Folding Proteins. Protein Function*. T. E. Creighton. New York: Oxford University Press.

Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K. 1998. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci*, 23:13453-58.

Schlabrakowski A. 2003. Spezifität der Inhibition von Cathepsin L- ähnlichen Cysteinproteasen mit ihren Propeptiden [Dissertation]. Jena: Medizinische Fakultät der Friedrich- Schiller- Universität.

Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, Riese R, Ploegh HL, Chapman HA. 1999. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*, 2:197-206.

Smith SM und Gottesmann MM. 1989. Activity and deletion analysis of recombinant human cathepsin L expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 264(34):20487-95.

Sohl JL, Jaswal SS, Agard DA. 1998. Unfolded conformations of alpha-lytic protease are more stable than its native state. *Nature*, 395(6704):817-9.

Tao K, Stearns NA, Dong J, Wu QL, Sahagian GG. 1994. The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys*, 311(1):19-27.

Timasheff SN und Arakawa T. 1997. Stabilization of protein structure by solvents. *Protein Structure*. T. E. Creighton. New York: Oxford University Press:349-364.

Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Arakawa T. 2003. Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. *Biochem Biophys Res Comm*, 312(4):1383-6.

Vijayalakshmi J, Mukherjee MK, Graumann J, Jakob U, Saper MA. 2001. The 2.2 Å crystal structure of Hsp33: a heat shock protein with redox-regulated chaperone activity. *Structure*, 9(5):367-75.

Villadangos JA, Bryant RA, Deussing J, Driessen C, Lennon-Dumenil AM, Riese RJ, Roth W, Saftig P, Shi GP, Chapman HA, Peters C, Ploegh HL. 1999. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev*, 172:109-20.

Visal S, Taylor MA, Michaud D. 1998. The proregion of papaya proteinase IV inhibits Colorado potato beetle digestive cysteine proteinases. *FEBS Letters*, 434:401-405.

Volkel H, Kurz U, Linder J, Klumpp S, Gnau V, Jung G, Schultz JE. 1996. Cathepsin L is an intracellular and extracellular protease in *Paramecium tetraurelia*. Purification, cloning, sequencing and specific inhibition by its expressed propeptide. *Eur J Biochem*, 238:198-206.

Wang B, Shi GP, Yao PM, Li Z, Chapman HA, Bromme D. 1998. Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization. *J Biol Chem*, 273(48):32000-8.

Wex T, Levy B, Wex H, Bromme D. 1999. Human cathepsins F and W: A new subgroup of cathepsins. *Biochem Biophys Res Comm*, 259(2):401-7.

Wiederanders B, Kaulmann G, Schilling K. 2003. Functions of Propeptide Parts in Cysteine Proteases. *Curr Prot Pep Sci*, 4: 309-326.

Yamamoto Y, Watabe S, Kageyama T, Takahashi SY. 1999. Proregion of *Bombyx mori* cysteine proteinase functions as an intramolecular chaperone to promote proper folding of the mature enzyme. *Arch Insect Biochem Physiol*, 42(3):167-178.

Zhu XL, Ohta Y, Jordan F, Inouye M. 1989. Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature*, 339(6224):483-4.

## **Danksagung**

Abschließend möchte ich allen danken, die mich unterstützt haben und so zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. B. Wiederanders gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme am Institut und die Überlassung des Themas. Er stand auch für die Diskussion inhaltlicher Probleme stets zur Verfügung und gab kritische und produktive Hinweise sowohl auf experimentellem Gebiet als auch bei der Anfertigung der schriftlichen Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Schilling, der mir mit seiner ausgezeichneten Betreuung stets zur Seite stand, viel Geduld zeigte und für ein freundliche und produktive Arbeitsatmosphäre sorgte.

Den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ich möchte mich auch bei den Doktoranden der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. K. Schilling bedanken, deren Hilfsbereitschaft und lockere Stimmung zu vielen schönen und lustigen Momenten im Labor führten.

Ganz zum Schluss, aber nicht zuletzt, danke ich meiner Familie, besonders meiner Schwester Claudia, für die liebevolle Unterstützung.



## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Saskia Sehmisch, geboren am 11.03.1982 in Leipzig, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. B. Wiederanders und Dr. K. Schilling,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit den Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Sehmisch  
Vorname: Saskia  
Anschrift: Löbderstr. 6  
07743 Jena  
Geburtsdatum: 11.03.1982  
Geburtsort: Leipzig  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung:**

09/1988 – 07/1992 Grundschole Leipzig  
08/1992 – 07/2000 Friedrich-Arnold-Brockhaus Gymnasium Leipzig  
Abschluss: Abitur

### **Hochschulbildung:**

seit 09/2000 Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
08/2002 Ärztliche Vorprüfung  
08/2003 Staatexamen (Ärztliche Prüfung, 1. Abschnitt)  
seit 09/2002 Promotion zum Thema: „Untersuchung der Propeptid-  
katalysierten Renaturierung von Cathepsin K“ am Institut  
für Biochemie der FSU Jena  
Betreuer: Prof. Dr. B. Wiederanders